

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für Experimentielle
Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Einfluss natriuretischer Peptide auf die endotheliale Glykokalyx

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Saller
aus
Deggendorf

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. Dr. rer.nat. Bernhard F. Becker
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. Jens Waschke Priv. Doz. Dr. rer.nat. Peter Neth
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. Matthias Jacob
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26. Januar 2012

GEWIDMET

MEINEN ELTERN

C.K.L.

IN DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden	14
2.1. Versuchstiere	14
2.2. Perfusat.....	14
2.2.1 Perfusionslösung	14
2.2.2 Natriuretische Peptide.....	15
2.2.3 Proteaseinhibitoren	16
2.3. Versuchsablauf	17
2.3.1 Versuchsgruppen	17
2.3.2 Herzpräparation	18
2.3.3 Langendorff-Modell.....	19
2.3.4 Versuchsaufbau	19
2.3.5 Versuchsprotokoll.....	21
2.3.6 Statistische Auswertung	22
2.4. Bestimmung funktioneller Parameter	24
2.4.1 Transsudat.....	24
2.4.2 Effluat	24
2.4.3 Ödembildung	24
2.5. Quantifizierung metabolischer Parameter	24
2.5.1 Laktat.....	25
2.5.2 Harnsäure	25
2.5.3 Purine	25
2.6. Bestimmung der Konzentration von Hydroxyethylstärke	26
2.6.1 Hydroxyethylstärke-Präparat.....	26
2.6.2 Nachweis von Hydroxyethylstärke	26
2.7. Nachweis von Heparansulfat und Syndekan-1	27
2.7.1 Nachweis von Heparansulfat.....	27
2.7.2 Nachweis von Syndekan-1 (CD138)	27
2.8. Elektronenmikroskopie	28

3. Ergebnisse	29
3.1. Versuchstiere	29
3.2. Perfusat	30
3.3. Versuchsablauf	30
3.4. Funktionelle Parameter	31
3.4.1 Transsudat	31
3.4.2 Effluat	33
3.4.3 Ödembildung	34
3.5. Quantifizierung metabolischer Parameter	35
3.5.1 Laktat	35
3.5.2 Harnsäure	36
3.5.3 Purine	36
3.6. Extravasation von Hydroxyethylstärke	37
3.7. Koronarvenöse Abgabe von Glykokalyx-Bestandteilen	39
3.7.1 Heparansulfat	39
3.7.2 Syndekan-1	41
3.7.3 Shedding unter Protease-Inhibition	43
3.8. Elektronenmikroskopie	44
4. Diskussion	46
4.1. Die Wirkung natriuretischer Peptide auf die Glykokalyx	46
4.2. Proteaseinhibitoren	47
4.3. Hydroxyethylstärke	49
4.4. Elektronenmikroskopie	50
4.5. Methodenkritik	51
4.6. Ausblick	53
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	57
7. Anhang	67
8. Abkürzungsverzeichnis	69

1. Einleitung

Das Gefäßendothel hat enorme Bedeutung als Gefäßbarriere. Ebenso spielt es eine wichtige Rolle für die Homöostase und Immunantwort, den Hormonhaushalt und die Gerinnung (Pries *et al.*, 2000; 2006). Darüber hinaus kommt dem Endothel eine wesentliche Funktion bei der Transduktion von Schubspannung zwischen dem strömenden Blut und der Gefäßwand zu (Jacob *et al.*, 2007b).

Die in diesem Zusammenhang gemachte Entdeckung des von den Endothelzellen gebildeten Stickoxids (NO) brachte wesentliche Erkenntnisse zur Endothelfunktion und wurde 1998 mit dem Nobelpreis für Physiologie ausgezeichnet (Furchgott, Ignarro, Murad, 1999). Die Stimulation der NO-Synthase erfolgt entweder rezeptorvermittelt über Aktivierung der IP_3 - Ca^{2+} -Calmodulin-Signalkaskade, oder aber über Scherkräfte, die über die Glykokalyx an das Zytoskelett übertragen werden. NO löst in den glatten Gefäßmuskelzellen eine Absenkung der Ca^{2+} -Konzentration und damit deren Relaxation aus und hemmt die Aktivierung von Leukozyten und Blutplättchen.

An der durch Schubspannung vermittelten Relaxation hat die endotheliale Glykokalyx einen wesentlichen Anteil (Thi *et al.*, 2004). Klinisch-pathophysiologisch nachgewiesen ist die Bedeutung der Glykokalyx bereits an der Blut-Harn-Schranke der Niere; ihr Fehlen („shedding“) führt hier zu Proteinurie (Singh *et al.*, 2007). Bei Proteinverlust-Enteropathie spielen die Glykokalyx und Shedding der Glykokalyx-Bestandteile Heparansulfat und Syndekan-1 eine bedeutende Rolle (Bode *et al.*, 2008).

Bedeutung der endothelialen Glykokalyx

Im lebenden Organ ist das Gefäßendothel einer Untersuchung nur schwer zugänglich. Vielleicht mag das ein Grund sein, warum die bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts vermutete Glykokalyx (Danielli, 1940) erst jetzt zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung rückt (Chappell *et al.*, 2008a). Die in der Endothelzellmembran verankerte Schicht aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen ist im gesamten Kreislaufsystem mehr oder minder stark vertreten. Ihre Funktion als Gefäßbarriere blieb jedoch lange Zeit unerkannt und unberücksichtigt. Mit einer vermeintlichen Dicke von weniger als 20 nm (Luft, 1966) wurde der Glykokalyx eine relevante physiologische Funktion abgesprochen.

Offenbar waren die früheren Messungen der Dicke der Glykokalyx durch eine ungenügende Fixierung verfälscht. Bei einer mit moderneren Fixierungsmethoden (Vogel *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2007) bestimmten Dicke von 200 nm bis hin zu 4 μm (Barker *et al.*, 2004) ist die Glykokalyx teilweise dicker als die Endothelzellen selbst. Einer direkten Interaktion von Immunzellen, speziell der Adhäsion von Leukozyten und deren Diapedese, wäre das Endothel nur nach einer entsprechenden Interaktion mit der Glykokalyx zugänglich (Mulivor & Lipowsky, 2002). Letztlich gelang im direkten Nachweis durch Intravitalmikroskopie *in vivo* (Potter & Damiano, 2008) auch die Bestätigung der Richtigkeit der Messergebnisse *ex vivo*.

Endothelial Surface Layer

Verantwortlich gemacht wird die Glykokalyx auch für inkonsistente Ergebnisse einiger Studien, die sich der Frage nach dem zirkulierenden Blutvolumen widmeten. Der „Fåhræus-Lindqvist-Effekt“ beschreibt die Beobachtung, dass Erythrozyten und andere korpuskuläre Bestandteile des Blutes niemals die intakte Gefäßwand berühren. Begründet wurde die Beobachtung bislang als rein physikalischer Effekt einer in Abhängigkeit vom Gefäßdurchmesser veränderlichen Viskosität. Die Viskosität des Blutes solle sich in kleineren Gefäßen dadurch verringern, dass die Erythrozyten in der Mitte des Blutstroms ankonzentrieren würden (Axialmigration), während nahe der Gefäßwand das weniger visköse Plasma fließe. Dieses Modell wurde durch Klitzman & Duling (1979) aufgrund des gegenüber dem Gesamtblut erniedrigten Kapillarhämatokrits zu einem Zwei-Phasen-Modell erweitert: Einer langsam fließenden Plasmaschicht (deren Dicke Klitzman mit 1,2 Mikrometer berechnet hatte) steht ein „normaler“ Blutstrom mit normaler Geschwindigkeit gegenüber, der die physiologische Durchblutung und den Sauerstofftransport wahrnimmt.

Ein nach Zerstörung der Glykokalyx abrupt ansteigender Kapillarhämatokrit (Desjardins & Duling, 1990) deutet an, dass Teile des Plasmavolumens offenbar bei intakter Glykokalyx nicht am Blutstrom teilnehmen, während sie nach Zerstörung der Schicht plötzlich mobilisiert werden, es zu einer Vermischung der beiden Phasen kommt und damit in den Kapillaren ein im Vergleich zum Hämatokrit in großen Gefäßen „normalisierter“ Hämatokrit herrscht.

Jacob *et al.* zeigten, dass auch nach längerer Nüchternheit vor großen chirurgischen Eingriffen bei ansonsten gesunden Patientinnen keine Hypovolämie vorliegt (Jacob

et al., 2008). Im Gegenteil: Eine bisher als „unschädlich“ betrachtete bereits präoperative Volumengabe hat sogar einen wesentlich niedrigeren Volumeneffekt als in der Situation z.B. einer akuten Blutung und eines tatsächlichen Volumenverlusts: Der Volumeneffekt der Infusion ist kontextsensitiv.

Darüber hinaus konnte in mehreren Studien (Lobo et al., 2002; Brandstrup et al., 2003; Nisanevich et al., 2005) gezeigt werden, dass eine Flüssigkeitsrestriktion positive Effekte auf die perioperative Morbidität haben kann. Eine Meta-Analyse von Hämodilutionsstudien (Pries et al., 1998) zeigte, dass es unter Hämodilution zur Reduktion des Gefäßwiderstands kommt, jedoch abhängig vom verwendeten Volumenersatzmittel. Dies ist möglicherweise auf eine individuelle Veränderung der Gefäßpermeabilität zurückzuführen. Neben weiteren Überlegungen zur Pathophysiologie dieser Vorgänge folgte diesen Studien eine nähere theoretische Betrachtung der physikalischen Barrierefunktion des Gefäßendothels.

Es entstanden zunehmend Ungereimtheiten, die sich nicht alleine mit der vom britischen Physiologen Ernest Starling beschriebenen Filter- und kolloidosmotischen Barrierefunktion erklären lassen (Starling, 1896). So bricht interessanterweise auch bei einer Angleichung der kolloidosmotischen Drucke zwischen Intravasalraum und Interstitium die Barrierefunktion nicht zusammen, wie es nach der Starling-Gleichung zu erwarten wäre (Levick, 2004; Chappell et al., 2008a).

Rehm et al. entwickelten in Modifikation der Starling-Gleichung das Konzept einer *double barrier*, einer zweiten Schicht, gebildet aus der endothelialen Glykokalyx, die additiv wie auch alternativ eine wirkungsvolle Barriere gegen Extravasation von Plasmabestandteilen darstellt (Rehm et al., 2004).

Der kolloidosmotische Druckgradient wird diesem Modell zu Folge direkt an der Basis der Glykokalyx aufgebaut. Mit Hilfe dieses Konzepts, das der endothelialen Glykokalyx eine wesentliche Aufgabe an der Gefäßbarriere zuschreibt, konnte die Starling-Gleichung sinnvoll ergänzt werden (Adamson et al., 2004; Jacob et al., 2007a) um das Konzept des *endothelial surface layer* zu entwickeln, bei dem die Gefäßbarriere erst aus der Interaktion von Endothelzellen, der endothelialen Glykokalyx und dem Plasma entsteht.

In der überarbeiteten Gleichung ist die Filtrationsrate (Q) gleich dem Produkt der hydraulischen Leitfähigkeit (V_H) und dem hydrostatischen Druckgradienten zwischen Gefäßlumen (P_G) und dem Interstitium (P_I), abzüglich der kolloidosmotischen Druckdifferenz zwischen Gefäßlumen (π_G) und - als Neuerung -

der Basis der endothelialen Glykokalyx (π_{EG}), weiterhin multipliziert mit dem Reflexionskoeffizienten Sigma (σ) (Levick, 2004).

$$Q = V_H \cdot (P_G - P_I) - \sigma \cdot (\pi_G - \pi_{EG})$$

Auch steht eine neue Option zur Verfügung, um die Pathophysiologie von Störungen zu erklären, die mit erhöhter Gefäßpermeabilität einhergehen, wie etwa in der Initialphase der Sepsis (Hotchkiss & Karl, 2003; Ellis *et al.*, 2005).

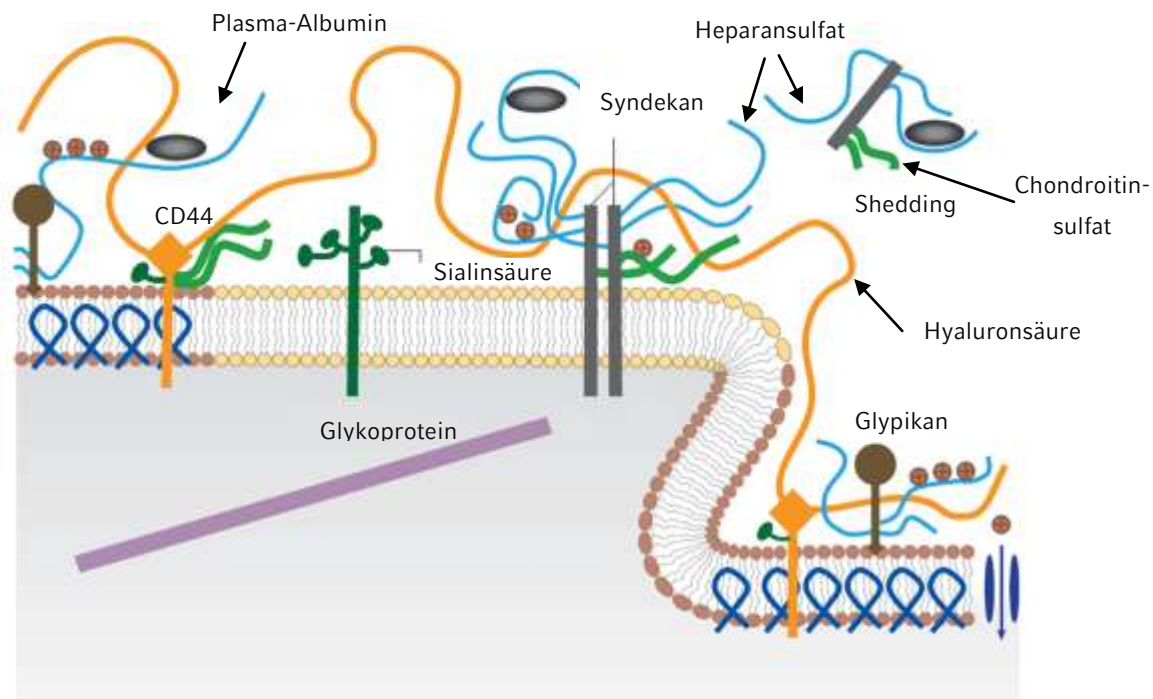


Abbildung 1: Aufbau der endothelialen Glykokalyx (Weinbaum *et al.*, 2007)

nach Tarbell & Pahakis (2006). CD44 ist ein Membranrezeptor für Hyaluronsäure; a,b und c bezeichnen verschiedene Zytoskelett-Interaktionen, + = Ca^{2+} , Na^{+} , etc.

Aufbau der Glykokalyx

Im Zuge des zunehmenden Interesses an der Glykokalyx wurde auch der Aufbau inzwischen detailliert aufgeklärt (Pries *et al.*, 2000; Weinbaum *et al.*, 2007). Die Glykokalyx ist eine negativ geladene Schicht, die auf allen Zellen, besonders stark ausgeprägt aber auf dem Gefäßendothel, vorkommt. Sie besteht aus einem organisierten Netz von membrangebundenen Glykoproteinen und Proteoglykanen (Syndekan-1), Glykosaminoglykanen, Heparan- und Chondroitinsulfaten und daran frei gebundenen Plasmaproteinen (Abbildung 1). Hyaluronsäure dient der Quervernetzung (Pries *et al.*, 2000). Das Endothel kann dabei offenbar aktiv die Zusammensetzung und die physiochemischen Eigenschaften der Glykosaminoglykane abhängig von den Anforderungen der Umgebung regulieren.

Glykosaminoglykane sind Heteropolysaccharide unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung. Von besonderer Bedeutung sind Heparansulfat (N-acetylglucosamin, HS), Chondroitinsulfat (N-acetylgalactosamine, CS) sowie Hyaluronsäure (HA). Heparansulfat macht 50–90 Prozent der Glykosaminoglykane aus. Chondroitinsulfate sind mit Kettenlängen zwischen 50 und 150 Disacchariden sehr größenvariabel; durchschnittlich sind sie 30 kDa groß. Über spezifische Bindungsstellen werden Heparansulfate und Chondroitinsulfate kovalent an Proteoglykane gebunden. Sulfatierung führt zu helikalen Formen (Pries *et al.*, 2000). Syndekane gehören zu den Transmembran-Proteinen, die in vier Isoformen jeweils unterschiedlicher Länge auftreten (Syndekan-1, -2, -3 und -4). Allen gemeinsam ist eine kurze zytoplasmatische Domäne mit Verbindung zum Zytoskelett (Abbildung 1, a–c), eine Einzelstrang-Transmembrandomäne und die extrazelluläre Bindungsdomäne mit drei bis fünf Heparansulfat- oder Chondroitinsulfatketten für die Interaktion mit einer Vielzahl weiterer Proteine, z.B. auch Antithrombin.

Syndekan-1 spielt eine ausgesprochen heterogene Rolle bei der Regulation von Inflammation und Wundheilung. Syndekan-4 hat große Bedeutung in der Transduktion von Schubspannung und bei der Interaktion mit Leukozyten.

Glypikan-1 ist über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Plasmamembran gebunden und besitzt drei von Heparansulfat besetzte sowie eine weitere Bindungsstelle (Pries *et al.*, 2000).

Hyaluronsäure ist die längste (1000 kDa) der an der Glykokalyx beteiligten Disaccharidketten. Sie interagiert mit der transmembranen CD44-Domäne und Chondroitinsulfatketten. Zur Bedeutung der Chondroitinsulfatketten ist bisher wenig bekannt (Tkachenko *et al.*, 2005).

Die sauren Oligosaccharide, Sialinsäure, Glykosaminoglykane und ihre Seitenketten tragen zur stark negativen Ladung und Hydratisierung der Schicht bei. Abhängig von ihrer elektrischen Ladung sind Plasmaproteine, Enzyme, Enzym-Inhibitoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine an die Schicht assoziiert. Wichtigstes, aber nicht einziges Plasmamolekül, das die Ausdehnung der Schicht wesentlich mitbestimmt, ist Plasma-Albumin. Albumin und weitere Moleküle stehen in einem „dynamischen Equilibrium“ (Pries *et al.*, 2000) mit den freien Plasmabestandteilen, wie schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die Ausdehnung der Schicht lässt sich auch durch die Zusammensetzung der Plasmaproteine modifizieren (Pries *et al.*, 1998).

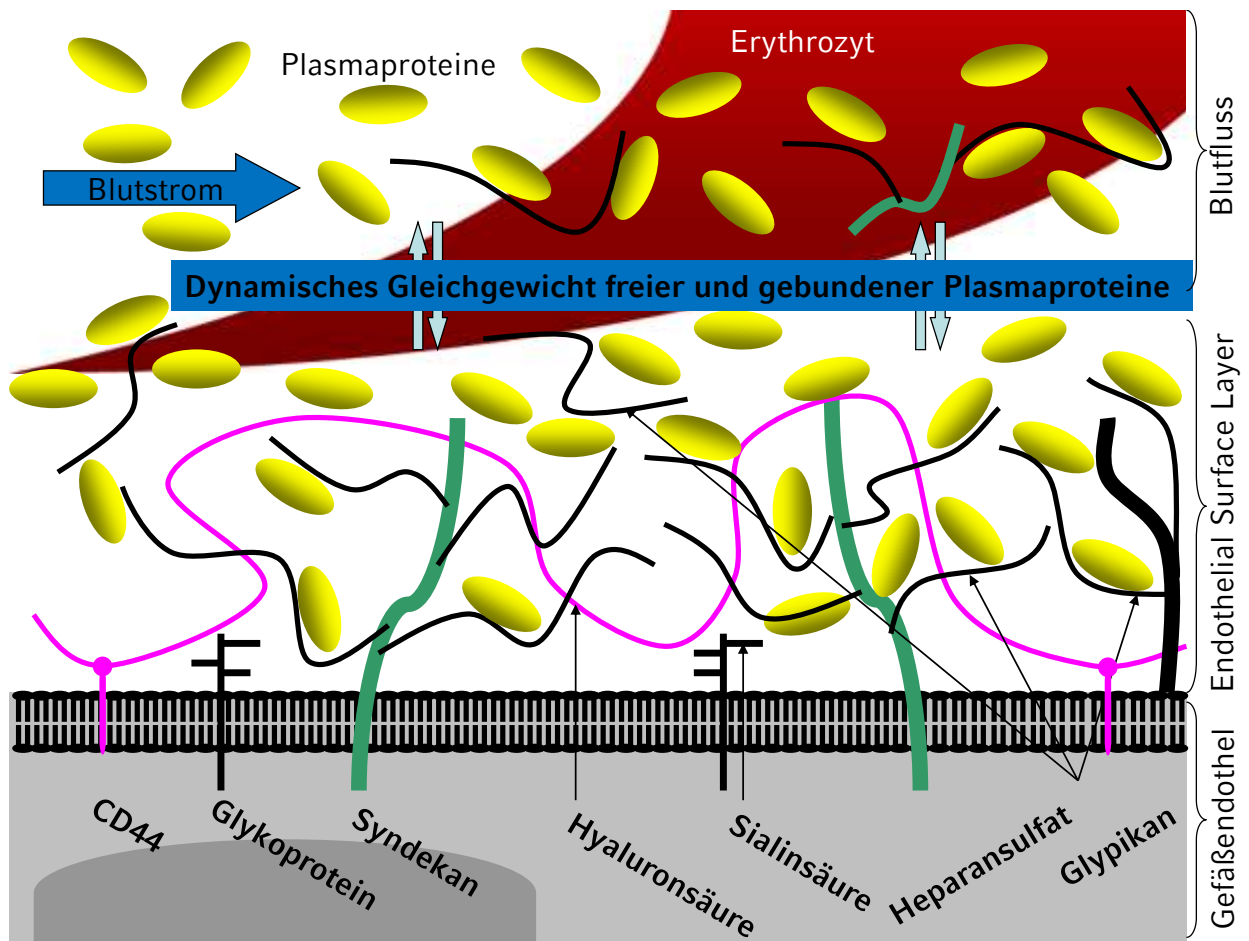


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx
 Chappell *et al.*, 2009b; Becker *et al.*, 2010b

Bedeutung von Shedding

Glykokalyx-Shedding bezeichnet das Abspalten von Glykokalyx-Bestandteilen – experimentell durch den Einsatz von Enzymen wie Heparinase, Neuraminidase oder Pronase (Mulivor & Lipowsky, 2002), und auf der Basis pathologischer Vorgänge (Nieuwdorp *et al.*, 2005), wie Ischämie und entzündlichen Prozessen (Henry & Duling, 2000; Marechal *et al.*, 2008). Geringe Basalkonzentrationen von Glykokalyx-Bestandteilen im Plasma können aufgrund eines Grundumsatzes im Sinne der Regeneration der Glykokalyx stets auch bei gesundem Endothel gemessen werden. Mit Shedding ist in der Regel ein Verlust membrangebundener Glykokalyx-Bestandteile gemeint. Shedding ist eine Reaktion, die auf eine beliebige Beeinträchtigung von Epithelien und Endothel folgen kann (Li *et al.*, 2002). Regelmäßig werden bei Zerstörung der Glykokalyx aber auch erhöhte Werte von an Syndekan befestigtem Heparansulfat und von Hyaluronsäure gemessen. Sie gelten daher ebenfalls als „Shedding-Parameter“.

Von der Matrix gelöste Heparansulfat-Bestandteile werden möglicherweise von dendritischen Zellen als Krankheitsmarker des Endothels wahrgenommen und können immunologische Prozesse auslösen (Johnson *et al.*, 2002). Heparansulfat stimuliert direkt den Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-2, der wiederum die Wundheilung und Tumorprogression anstößt und die Angiogeneese stimuliert (Kato *et al.*, 1998).

Während Heparanase und Hyaluronidase an der Glykokalyx die entsprechenden Seitenketten bzw. angelagerten Moleküle einfach abbauen können, ist das Shedding von Syndekan direkt an der Basis der Zellmembran deutlich komplexer. Überraschenderweise induziert Shedding von Heparansulfat durch Heparanase auch ein gewisses Shedding von Syndekan-1 (Yang *et al.*, 2007). Der Mechanismus, über den dies vermittelt wird, blieb bisher ungeklärt.

Die Bedeutung der Syndekane ist hochkomplex (Brule *et al.*, 2006). TNF-alpha reguliert die Expression von Syndekan-1 (Tkachenko *et al.*, 2005). Das Fehlen von Syndekan-1 auf Tumorzellen führt zu aggressiverem Tumorstadium (Harada *et al.*, 2003) und bei Syndekan-Knockout-Mäusen zu verstärkter Interaktion von Leukozyten am Endothel (Gotte *et al.*, 2002). Damit zeigt sich Syndekan-1 nicht nur als reines Ankerprotein, sondern möglicherweise ebenso als entscheidende Schaltstelle bei krankhaften Prozessen.

In der Zellkultur führt Zugabe von Thrombin sowohl direkt als auch rezeptorvermittelt (Protease-aktivierter Faktor, PAR 1) zum Shedding von Syndekan. Zugabe von Serum verhindert Shedding durch Thrombin. Vermutlich sind dafür Serumproteaseinhibitoren wie Antithrombin III verantwortlich, denn die direkte Aktivierung des PA-Rezeptors unter Umgehung der Serinproteasenwirkung des Thrombins ist durch Serum nicht hemmbar.

Antithrombin ist ein potenter Inhibitor polyvalenter Serinproteasen (Abildgaard, 2007) und erfüllt seine antikoagulatorische Wirkung durch die direkte Wirkung auf Thrombin. Es hemmt die Proteasefunktion dieses Proteins durch kovalente Bindung. Weiter hemmt es in der Blutgerinnung vor allem den Faktor Xa durch eine kovalente, durch Heparin um das tausendfach gesteigerte Bindung, sowie in geringerem Ausmaß die Faktoren IXa und XIa (Thomas, 2005).

Bei einer erhöhten intravasalen Gerinnungsaktivierung mit viel Thrombinbildung wird mehr AT verbraucht, als nachsynthetisiert werden kann. Antithrombin liegt *in vivo* in einem löslichen und einem gebundenen Zustand vor; diese gebundenen AT-

Moleküle sind wahrscheinlich an den Heparansulfatresten des Endothels gebunden und werden von diesen auch aktiviert (Carlson *et al.*, 1985). Die Substitution von AT III findet in der Therapie der Sepsis bereits erfolgreich Anwendung (Eisele *et al.*, 1998).

Auch Tyrosinkinaseinhibitoren können Shedding nicht vollständig verhindern, so dass vermutlich noch über weitere Signalwege Shedding vermittelt wird (Subramanian *et al.*, 1997).

Adenosin führt zum Shedding von Glykokalyx-Bestandteilen über die Wirkung am Adenosin-A3-Rezeptor. Bei einer entsprechenden Rezeptor-Knockout-Maus konnte keine Veränderung an der Glykokalyx festgestellt werden (Platts & Duling, 2004).

Glykokalyx-Shedding durch natriuretische Peptide

Beim Menschen sind drei unterschiedliche natriuretische Peptide beschrieben worden, die nachfolgend kurz charakterisiert werden.

Atriales natriuretisches Peptid (ANP) besteht aus einer Sequenz von 28 Aminosäuren, wird hauptsächlich in den Vorhöfen des Herzens gebildet, in Granula gespeichert und per Exozytose freigesetzt. ANP führt als endokrine Antwort auf Hypervolämie (de Bold *et al.*, 2001) zu einer Erhöhung der renalen Natrium- und Wasserexkretion. Dabei kommt es durch Inhibition der Freisetzung von Renin, ADH und Aldosteron und der Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zur Verminderung von Durst und Salzhunger sowie zur Vasodilatation (Baliga *et al.*, 2008).

Ein weitgehend ignorierte Effekt von ANP besteht in der raschen Förderung von Plasmaextravasation im vaskulären System, d.h. in einer raschen Modifikation der Gefäßpermeabilität.

Natriuretisches Peptid vom Typ B (BNP, 32 Aminosäuren) wurde zunächst aus dem Gehirn isoliert, daher stammt auch das häufig verwendete Synonym Brain Natriuretic Peptide. Es wird aber – ähnlich wie das ANP – hauptsächlich in kardialen myoendokrinen Zellen synthetisiert (Forssmann *et al.*, 1998).

Natriuretisches Peptid vom Typ C (C-type natriuretic peptide, CNP, 22 Aminosäuren) wird vor allem in Endothelzellen und der Niere synthetisiert (Chen HH, 1998).

Für ein weiteres natriuretisches Peptid, das D-Typ Natriuretisches Peptid (DNP, 38 Aminosäuren), das aus dem Gift der grünen Mamba *Dendroaspis angusticeps* isoliert wurde, sind Vorkommen und Funktion unklar (Schweitz *et al.*, 1992).

Natriuretische Peptide vermitteln ihre Wirkung über die membranständigen Rezeptoren NPR-A und NPR-B mit jeweils unterschiedlicher Bindungsaffinität der Peptide (siehe Tabelle 1). In Folge der Bindung wird eine membranständige Guanylylcyclase A aktiviert, die zur Erhöhung der intrazellulären Spiegel von cGMP führt. Dies hat eine Aktivierung einer Proteinkinase G zu Folge, die wachstumsinhibierende, antiproliferative und offenbar permeabilitätssteigernde Wirkungen vermittelt. Bei NPR-A-Knockout-Mäusen fehlt dieser Effekt. Im Vergleich führt die lokale Gabe von Histamin dort jedoch zu einer schnelleren und ausgeprägteren Permeabilitätssteigerung nach extravasal (Schreier *et al.*, 2008). Die ANP-induzierte Permeabilitätssteigerung wird also durch einen anderen Weg induziert als es durch Histamin erfolgt.

Der dritte Rezeptor für natriuretische Peptide, der C-Typ-Rezeptor, soll schon aufgrund seiner Häufigkeit große Bedeutung als Clearance-Rezeptor und ANP-Zwischenspeicher haben. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass der Rezeptor die cGMP-Bildung zusätzlich fördert, ohne direkt eine Wirkung auf die Guanylylcyclase zu haben (Koller & Goeddel, 1992). Möglicherweise sind daran weitere second-messenger-Systeme beteiligt (Anand-Srivastava & Trachte, 1993).

Beide Rezeptorklassen sollen an der Regulation des Fibroblastenwachstums beteiligt sein, Daten zum Einfluss auf das Bindegewebe fehlen aber bislang (Redondo *et al.*, 1998). Schreier *et al.* (2008) postulierten, dass natriuretische Peptide über den C-Typ-Rezeptor eine entgegengesetzte Wirkung auf die Barrierefunktion des Endothels haben könnten.

Tabelle 1: Dissoziationskonstanten natriuretischer Peptidrezeptoren
(nach Koller & Goeddel, 1992)

Rezeptor	ANP	BNP	CNP
NPR-A	1.9 pM	7.3 pM	>500 nM
NPR-B	5.4 nM	30 nM	7 pM
NPR-C	2.6 pM	13 pM	10.8 pM

In Anbetracht der Permeabilitätseffekte wurde die Wirkung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) auf die endotheliale Glykokalyx untersucht (Bruegger *et al.*, 2005). Bruegger konnte erstmals in einem isolierten Organmodell einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von ANP und der Integrität der endothelialen Glykokalyx herstellen. Eine ANP-Perfusion in supraphysiologischer Dosierung (10^{-9} M) führte zur Zerstörung der Glykokalyx, gemessen an der

Freisetzung von Syndekan-1. Zusätzlich wurde die Zerstörung der Glykokalyx elektronenmikroskopisch dokumentiert. Bereits sechs Minuten nach Beginn der Infusion von ANP konnte ein gesteigerter Efflux von Syndekan im koronarvenösen Effluat gemessen werden.

Wie genau ANP und ob auch andere natriuretische Peptide über ihre Rezeptoren zum Shedding von Syndekan-1 führen, blieb aber völlig unklar. Ebenso wirft die angeführte Arbeit die Frage nach der Dosisabhängigkeit der Wirkung von natriuretischen Peptiden auf.

Shedding ist rezeptorvermittelt

Das Ablösen („Shedding“ oder „Solubilisation“) von Membranproteinen, zu denen die Bestandteile der endothelialen Glykokalyx zweifellos gehören, erfordert eine Protein-Hydrolyseresaktion durch Proteasen oder Phospholipasen (Hooper *et al.*, 1997). In Frage für diese Aufgabe kommt ein Vertreter aus der mehr als 20 Mitglieder großen Familie der Matrixmetalloproteasen (MMP).

Sie sind alle Zink-abhängige Endopeptidasen, die selbst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (Massova *et al.*, 1998; Nagase & Woessner, 1999; Visse & Nagase, 2003).

Die Beobachtung, dass die Freisetzung einiger Membranproteine sowohl von Metallo- als auch Serinprotease-Inhibitoren geblockt wird, führte zu der Annahme, dass es sich um eine proteolytische Kaskade handeln könnte (Hooper *et al.*, 1997).

Für Shedding scheint nicht unbedingt eine bestimmte Sheddase verantwortlich zu sein. Vielmehr arbeiten mehrere Sheddasen gewebsspezifisch zusammen, vielleicht sogar krankheitsspezifisch (Park *et al.*, 2004).

Unter den löslichen Sheddasen spielt offenbar MMP-7 eine wichtige Rolle. Bekannt ist zudem, dass das Shedding u.a. von Syndekan über verschiedene intrazelluläre Signalwege durch Aktivierung einer Metalloprotease getriggert werden kann, die für den gewebsspezifischen Inhibitor der Metalloprotease 3 (TIMP-3) sensitiv ist (Subramanian *et al.*, 1997). Als Auslöser gelten Rezeptor-Aktivierung, zellulärer Stress und weitere Effektoren. Weitgehend unbekannt ist, auf welchem Weg genau diese Effektoren ein Shedding anstoßen und so die Glykokalyx kompromittieren können.

Vermutlich kann Syndekan-1 auch als Transporter oder Lokalisator für Chemokine dienen, die einen Neutrophilen-Einstrom ins Gewebe antreiben; bei Syndekan-1-Knockout-Mäusen blieb dieser Einstrom nämlich aus. Bei MMP-7 (Matrilysin)-

Knockout-Mäusen wurde sowohl Shedding als auch ein Neutrophilen-Einstrom verhindert. Shedding von Syndekan-1 kommt also eine herausragende Rolle in der Neutrophilen-Transmigration zu (Li *et al.*, 2002).

Als eine Funktion von Syndekan-4 konnte eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) gefunden werden, die selbst wieder Shedding unterhält. An der zytyoplasmatischen Domäne von Syndekan-4 wurde die Aktivität der PKC nachgewiesen (Lim *et al.*, 2003). Brule *et al.* (2006) zeigten, dass Shedding von Syndekan-1 und -4 abhängig ist vom Vorhandensein gebundener Heparansulfatseitenketten sowie der Verfügbarkeit des PKC-Wegs. Nach Vorbehandlung mit Heparinase wurde weniger Shedding gemessen.

Die Bindung des Chemokins stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) an Syndekan-4 erfordert Gykosaminoglykane auf der Zelloberfläche (Hamon *et al.*, 2004). Das Chemokin selbst konnte wiederum Shedding von Syndekan-1 und -4 verursachen und zwar abhängig vom Chemokinrezeptor CXCR4, einem wesentlichen Korezeptor bei der HIV-Infektion (Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2001). Auch hier scheint Syndekan also eine Rolle zu spielen.

Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind sehr wahrscheinlich an der Pathogenese von hypertrophen Herzerkrankungen beteiligt (Weber *et al.*, 1995). Während die Spiegel an MMP bei noch kompensierter hyperthropher Herzinsuffizienz im Tiermodell erhöht waren, kam es am Übergang zur Dekompensation zu einem Abfall der MMP-Aktivität zugunsten eines MMP-spezifischen Inhibitors (TIMP). Das Verhältnis zwischen Aktivierung und Hemmung des Umbaus der Extrazellulärmatrix (ECM) scheint also den Fortgang des kardialen Remodelings zu beeinflussen (Tozzi *et al.*, 2007).

TIMP-3, jedoch nicht TIMP-1 und -2 hemmen Matrix-Metalloproteasen spezifisch. Dagegen kann TIMP-3 kontinuierliches Shedding als Ausdruck eines natürlichen Turnovers der Zellmembran nicht verhindern.

Offensichtlich halten Matrix-Metalloproteasen eine Schlüsselstellung bei pathologischen Prozessen an der Zellmembran inne und könnten damit auch am Glykokalyx-Shedding durch natriuretische Peptide beteiligt sein. Eine Hemmung von Matrix-Metalloproteasen sollte damit, zumindest teilweise, das ANP-bedingte Shedding verhindern.

Im *in vivo*-Versuch und am schlagenden Herzen *ex vivo* ist aber der Einsatz von EDTA zur Komplexbindung der Zink-Ionen der MMPs (wie bei Subramanian *et al.*

(1997) beschrieben) nicht möglich, da EDTA auch die für die Muskelfunktion essentiellen Kalzium-Ionen komplexieren würde. Es gilt also einen spezifischen Inhibitor zu finden, der keinen oder nur geringen Einfluss auf die Herzfunktion besitzt.

Fragestellung

Das Gefäßendothel und die endotheliale Glykokalyx als ein essentieller Teil davon haben große Bedeutung für physiologische und pathophysiologische Vorgänge. Diese Beteiligung ist zum Teil noch ungeklärt.

Besonders die Rolle natriuretischer Peptide bei der Induktion von Shedding ist erst ansatzweise bekannt. Die vorliegende Arbeit soll mit der Beantwortung folgender Fragen zur Klärung des Zusammenhangs beitragen:

1. Unterscheiden sich die Wirkungen von ANP auf die Glykokalyx in physiologischer und supraphysiologischer Konzentration?
2. Unterscheidet sich die konzentrationsabhängige Wirkung von ANP auf das Shedding verschiedener Bestandteile der endothelialen Glykokalyx?
3. Haben weitere natriuretische Peptide (BNP, CNP) dem ANP vergleichbare Wirkung auf die endotheliale Glykokalyx?
4. Lässt sich durch Hemmung von Metalloproteasen der Effekt des ANP auf die endotheliale Glykokalyx beeinflussen?

2. Material und Methoden

Die Laborversuche zu dieser Arbeit fanden in der Zeit von Februar bis Dezember 2007 am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin (vormals Physiologisches Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität München), Vorstand Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker am Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie statt. Alle benutzten Materialien sind im Folgenden aufgeführt.

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausschließlich 15–26 Tage alte männliche Meerschweinchen (HsdPoc:DH) der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, verwendet.

Die Tiere wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in entsprechend ausgestatteten Tierställen gehalten und erhielten eine Standarddiät mit Trockenfutter und Wasser ad libitum. Es war ein regelmäßiger ca. 12-stündiger Tag-/Nachtrhythmus gewährleistet. Die Genehmigung der Regierung von Oberbayern lag vor (Az.: 209.1/211–2531.3–3/99).

2.2. Perfusat

2.2.1 Perfusionslösung

Als Perfusionslösung für die Versorgung der isolierten Meerschweinchenherzen mit Nährstoffen wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung (Bünger, Kammermeier, Gerlach; 1975) verwendet, Zusammensetzung siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Perfusionslösung; modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung

Verbindung	Summenformel	c [mmol/l]	Hersteller/Bezug über
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	5,4	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	KH_2PO_4	1,2	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	$CaCl_2 \times 2H_2O$	1,27	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,60	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	$NaCl$	119	Applichem GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	21,5	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	0,3	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insulin (Rinderpankreas)	$C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$	5 I.E./l	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Die Lösung wurde für jeden Versuchstag aus vorbereiteten Stammlösungen (Tabelle 2) frisch angesetzt und bis zur Verwendung bei 8° Celsius gekühlt gelagert. Glucose, Pyruvat und Insulin wurden jeweils erst kurz vor dem Versuch zugemischt. Erst dann wurde das Perfusat in den gewärmten Vorratsbehälter der Perfusionsapparatur überführt und sofort mit einer Mischung aus 94,4 Prozent Sauerstoff und 5,6 Prozent Kohlendioxid mit einem Perlator begast.

2.2.2 Natriuretische Peptide

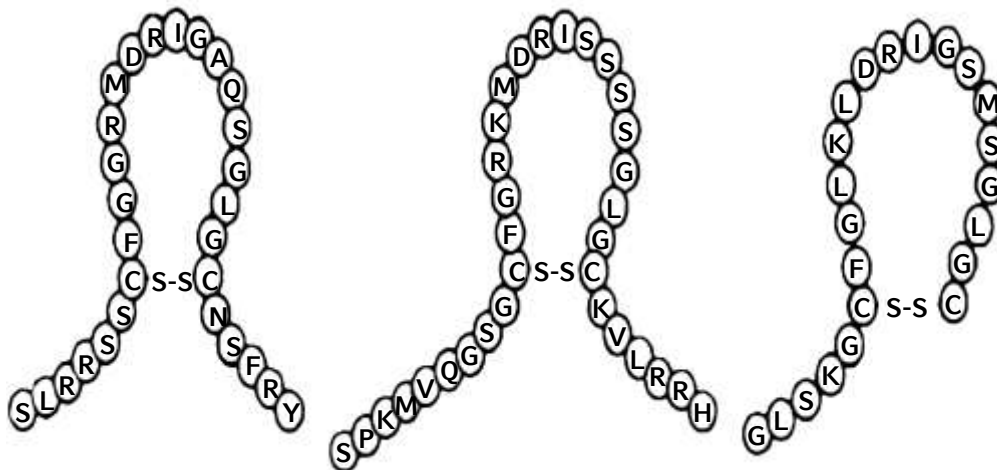


Abbildung 3: Aminosäurestrukturen von ANP, BNP und CNP
(nach Cowie & Mendez, 2003)

2.2.2.1 Atriales Natriuretisches Peptid (ANP)

Atriales Natriuretisches Peptid wird von myoendokrinen Zellen, vor allem in den Vorhöfen des Herzens, synthetisiert (Palluk *et al.*, 1985). Für die Versuche zur stimulierten Degradation der Glykokalyx wurde ein synthetisches ANP-Präparat der Ratte der Firma Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA verwendet (Proteinprimärstruktur: Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr; Disulfidbrücke: 7–23, siehe Abbildung 3). Es unterscheidet sich von humanem ANP nur an der Aminosäure in Position 12 (Met, M → Ile, D).

2.2.2.2 Natriuretisches Peptid Typ B (BNP)

Natriuretisches Peptid vom Typ B wurde zunächst aus dem Gehirn isoliert, daher stammt auch das häufig verwendete Synonym Brain Natriuretic Peptide. Es wird aber – ähnlich wie das ANP – hauptsächlich in kardialen myoendokrinen Zellen synthetisiert (Forssmann *et al.*, 1998). Für die Versuche zur stimulierten Degradat-

ion der Glykokalyx wurde ein synthetisches BNP-Präparat der Ratte der Firma Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA verwendet (Proteinprimärstruktur: Asn-Ser-Lys-Met-Ala-His-Ser-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gln-Lys-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Val-Ser-Arg-Leu-Gly-Cys-Asp-Gly-Leu-Arg-Leu-Phe; Disulfidbrücke 10–26, Abbildung 3).

2.2.2.3 Natriuretisches Peptid Typ C (CNP)

Natriuretisches Peptid vom Typ C (C-type natriuretic peptide, CNP) wird vor allem in Endothelzellen und der Niere synthetisiert. Im Gehirn liegt die höchste CNP-Konzentration vor (Minamino *et al.*, 1993; Chen HH, 1998). Für die Versuche zur stimulierten Degradation der Glykokalyx wurde ein CNP-Präparat der Firma Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA verwendet (Proteinprimärstruktur: Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys; Disulfidbrücke: 6–22, siehe Abbildung 3).

2.2.3 Proteaseinhibitoren

2.2.3.1 Antithrombin III (AT III)

In der Arbeit wurde für eine Inhibitions-Versuchsgruppe (**AT III**, n=7) das Antithrombin III-Produkt der Firma CSL Behring, Marburg (Kybernin® P) verwendet. Substituiert wurde gemäß der Fachinformation (ZLB Behring, 2004) 1 IE Kybernin® pro Milliliter Serum, entsprechend 1 IE / ml Koronarfluss, um eine physiologische Aktivität herzustellen.

2.2.3.2 Proteaseinhibitorgemisch

Für eine kleinere Versuchsgruppe (**PI**, n=4) wurde die Hemmung des Glykokalyx-Sheddings mit dem Produkt Protease-Inhibitor-Mix HP Plus (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) versucht. Es ist ein Gemisch mehrerer Inhibitoren verschiedener Proteasen-Gruppen (siehe Tabelle 3), enthält jedoch keine ausgewiesenen Metalloproteaseinhibitoren.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Protease-Inhibitor-Mix

Komponente	Ziel-Protease
AEBSF-HCl	Serinproteasen
Bestatin	Aminopeptidase B, Leucin-Aminopeptidase
E-64	Cystein-Proteasen
Pepstatin A	Aspartat-Proteasen
Phosphoramidon	Thermolysine, Kollagenasen, bakt. Metalloendoproteasen

15,9 mg des Gemisches wurden dabei in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Gemäß der Packungsbeilage wurde damit eine 50-fach konzentrierte Lösung erreicht. Diese Lösung wurde über eine Spritzenpumpe direkt oberhalb der Aortenkanüle in das Perfusat infundiert, adaptiert nach Koronarfluss zu 20 µl/ml/min.

2.2.3.3 Ortho-Phenanthrolin



Abbildung 4: Chemische Struktur von 1,10-ortho-Phenanthrolin

Als weiterer Hemmstoff wurde für eine kleinere Versuchsgruppe (**OP**, n=5) der global wirksame Metalloproteasen-Inhibitor 1,10-ortho-Phenanthrolin-Monohydrat ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$, AppliChem GmbH, Darmstadt) in einer Konzentration von 10 µmol/l verwendet. OP wird in der Analytik wegen seiner Funktion als Metallionenchelator als Farbindikator genutzt.

Im Gegensatz zu EDTA bindet OP Metallionen reversibel, was die Anwendung in der Biochemischen Forschung interessant macht.

2.3. Versuchsablauf

2.3.1 Versuchsgruppen

Für die Arbeit wurden insgesamt acht Versuchsgruppen (Tabelle 4) mit einer Fallzahl von sieben geplant. Einer Kontrollgruppe, die die Veränderungen am Modell aufzeigen sollte, wurden vier Gruppen gegenübergestellt, die Aussagen über die Wirkungen von natriuretischen Peptiden auf die endotheliale Glykokalyx erlauben sollten: Die natriuretischen Peptide ANP in physiologischer (10^{-11} M) und niedrig pathologischer (10^{-10} M) Konzentration, BNP und CNP.

Die Wirkung der ausgesuchten Proteaseinhibitoren OP, PI und AT III wurde dann anhand des Gruppenvertreter ANP in pathologischer Konzentration (10^{-10} M) überprüft. Hier lag die Fallzahl bei sieben (AT III), vier (PI) bzw. fünf (OP). Insgesamt wurden 49 Herzen in acht Gruppen untersucht.

Tabelle 4: Versuchsgruppen

Die Tabelle zeigt die Versuchsgruppen mit dem jeweils infundierten natriuretischen Peptid und bei den Versuchsgruppen mit Inhibitor den verwendeten Stoff, siehe auch Abbildung 6.

Gruppe	n	Natriuretisches Peptid	Inhibitor
Kontrolle	7	–	–
ANP 10^{-10} M	6	ANP 10^{-10} M	–
ANP 10^{-11} M	7	ANP 10^{-11} M	–
BNP	6	BNP 10^{-9} M	–
CNP	7	CNP 10^{-9} M	–
AT III	7	ANP 10^{-10} M	AT III 1 IE/ml CF
PI	4	ANP 10^{-10} M	PI-Mix (siehe 2.2.3.2)
OP	5	ANP 10^{-10} M	10 μ mol/l

2.3.2 Herzpräparation

Für die Herzpräparation wurden die Meerschweinchen mit einem speziellen Instrument durch Nackenschlag betäubt und auf einen Kleintieroperationstisch fixiert. Durch Eröffnen der Arteriae carotis communes beidseits wurden sie getötet und teilweise exsanguiniert. Dann erfolgte durch Rippenbogenrandschnitt das Eröffnen des Thorax, gefolgt von der großzügigen Resektion von Sternum, Rippen, Lungen, Thymus und Perikard. Durch gleichzeitiges Übergießen mit 4° Celsius kalter Natriumchloridlösung (0,9 %) wurde eine sofortige Abkühlung des Herzens erreicht mit der Folge eines thermischen Herzstillstands. Die Kühlung wurde bis zum Einführen der Aortenkanüle weitergeführt. Dazu wurde die Aorta ascendens vom umliegenden Fett- und Bindegewebe befreit, angeschlungen und nach ventraler Inzision die Perfusat fördernde Aortenkanüle eingeführt und in das Gefäß eingebunden, so dass das Herz sofort wieder zu schlagen begann. So wurde die kritische Ischämiezeit des Herzens deutlich unter einer Zeit von drei Minuten gehalten.

Die weitere Präparation des Herzens erfolgte unter langsam ansteigendem Druck und dann unter druckkonstanten Bedingungen mit einem Aortendruck von 80 cm H₂O. Die Venae azygos und hemiazygos wurden durchtrennt, die Aorta distal der eingebundenen Kanüle, die Arteria pulmonalis bis zur Bifurkation mobilisiert und möglichst weit distal durchtrennt, das Herz aus dem umgebenden Bindegewebe befreit und schließlich nach Durchtrennen der Venae cavae superior und inferior aus dem Thorax entnommen.

Anschließend wurden die Gefäßstümpfe der Venae cavae superior, inferior und die Insertionsstellen der Venae pulmonales ligiert. Zuletzt wurde eine Stahlkanüle in die Arteria pulmonalis zum Ableiten des koronarvenösen Effluats eingebunden, an deren Ende eine Ultraschall-Flussmesssonde angebracht war (T206, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA). Eine weitere Flussmesssonde war zwischen Wärmespindel und T-Stück angebracht (siehe Abbildung 5).

2.3.3 Langendorff-Modell

Die Methode des isoliert perfundierten Säugerherzens wurde von Oscar Langendorff, einem 1853 geborenen Rostocker Mediziner und Physiologen 1895 entwickelt. Seitdem ist die Methode ein etabliertes und anerkanntes Verfahren zur Untersuchung der Funktionsweise des Herzens (Zimmer, 1998). Döring und Dehnert schlugen eine modifizierte Version des ursprünglichen Modells vor, die heute vorzugsweise verwendet wird (Döring, 1988).

Dabei wird das Herz retrograd, also über die Aorta perfundiert. Über den Perfusionsdruck in der Aortenkanüle kommt es zum Schluss der Aortenklappe, das Perfusat kann auf orthogradem Weg die Koronararterien durchströmen und so die Ver- und Entsorgung des Myokards sicherstellen. Aus dem venösen Schenkel der Koronargefäße gelangt das Perfusat nun in den Sinus coronarius und damit in den rechten Vorhof und Ventrikel, bevor es über die Pulmonalarterie und die darin eingebundene Stahlkanüle als koronares Effluat wieder ausgeworfen wird. Als Transsudat wird die Flüssigkeit bezeichnet, die vom Herzen frei abtropft und entspricht damit der koronarvenösen Lymphe.

Das Langendorff-Modell erlaubt damit genaue Aussagen über die Funktion der Koronargefäße, während die Herzfunktion weitgehend unberücksichtigt bleibt.

2.3.4 Versuchsaufbau

Für die Durchführung der Versuche ist eine Apparatur notwendig, die gleichmäßig konstante Mengen an angewärmtem und begastem Perfusat unter isobaren Bedingungen liefert.

Dazu wurde in einem doppelwandigen Vorratsbehälter das Perfusat mit einem Gasgemisch aus 94,4 % Sauerstoff und 5,6 % Kohlendioxid (beide Linde AG, Höllriegelskreuth) durchperlt (siehe Abbildung 5). Das Verhältnis wurde durch die Verwendung einer Gasmischpumpe (K. Wösthoff OHG, Bochum) konstant gehalten und die Zielwerte P_{aO_2} und P_{aCO_2} oxymetrisch bzw. kapnometrisch kontrolliert

(siehe Tabelle 8). Eine Thermostat-Wärmepumpenanlage (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württemberg) sorgte für die gleichmäßige Anwärmung von Perfusatvorrat und einer Durchlaufwendel kurz vor dem Herzpräparat.

Durch eine Peristaltikpumpe (MS-1 Reglo/8-160, Ismatex Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld) wurde ein gleichmäßiger Perfusionsfluss etabliert. Um jedoch druckkonstante Bedingungen zu schaffen, konnte überschüssiges Perfusat über ein T-Stück in einem Steigrohr aufsteigen und bei einer Höhe von 80 cm Wassersäule abtropfen.

Vor dem T-Stück konnten an einem Dreihwegehahn das HES-Präparat, direkt vor dem Abgang zur Aortenkanüle, die natriuretischen Peptide sowie die Inhibitorsubstanzen kontrolliert durch Spritzenpumpen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen; Precidor HAT, Infors AG, Basel, Schweiz) zugegeben werden. Außerdem wurde täglich direkt am T-Stück eine Perfusatprobe entnommen und hinsichtlich pH, Elektrolyten und Gaspartialdrücken an einem Blutgasanalysator untersucht (Rapid point 405, Bayer Vital GmbH, Fernwald).

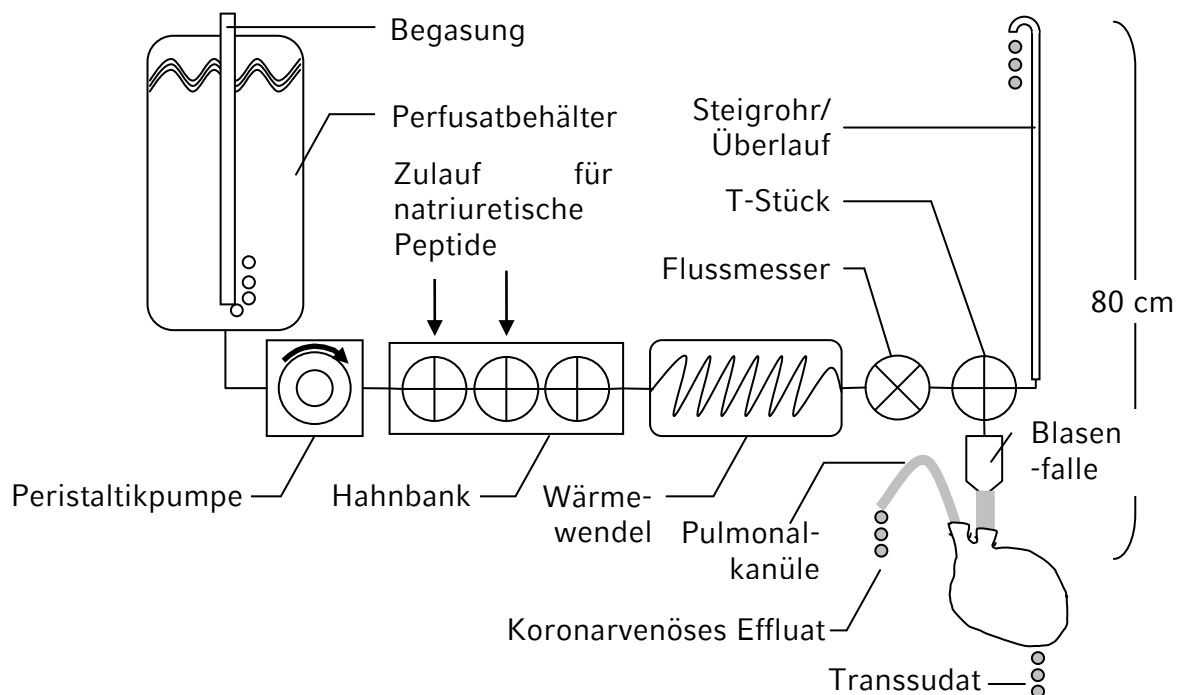


Abbildung 5: Skizze der modifizierten Langendorff-Apparatur (nicht maßstabsgetreu)

Aus dem Perfusatbehälter fließt das Perfusat, gefördert über eine Peristaltikpumpe, durch eine Wärmespindel. Zuvor können natriuretische Peptide zugegeben werden. Über ein T-Stück werden das Versuchsherz perfundiert bzw. kann überflüssiges Perfusat über ein Steigrohr abtropfen. Nach der koronaren Perfusion tropft das Koronarvenöse Effluat aus der Pulmonalkanüle ab.

2.3.5 Versuchsprotokoll

Für die Versuche wurde ein Protokoll (siehe Abbildung 21, Anhang Seite 67) vorbereitet, in dem Werte aller vorher festgelegten Parameter dokumentiert und anschließend in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Office Excel 2003 SP2, Microsoft Corporation) gespeichert wurden.

Dokumentiert wurden Nettogewicht der Versuchstiere, pH, $P_a\text{CO}_2$ und $P_a\text{O}_2$ des Perfusats, die Förderrate der Rollerpumpe, der Aortendruck und der Überlauffluß. Die Zeiten von Präparationsbeginn bis Reperfusionsbeginn sowie die Gesamtzeit für die Präparation wurden festgehalten. Besonderheiten am Versuchstier oder bei der Präparation wurden in einem eigenen Textfeld vermerkt. Die Temperatur von Epikard und Effluat wurde mit einem Analog-Thermometer (Metrastast P60, Metrawatt AG, Nürnberg) bestimmt. Lag die Effluat-Temperatur unter 35,5° Celsius, wurde das Herz mit einer gewärmten Hülle vor weiterer Auskühlung geschützt. Zur Kontrolle wurde auch am Versuchsende nochmals die Temperatur bestimmt (Ergebnisse wurden nicht ausgewertet).

Auch ein Hitzeschock kann zum Shedding führen (Fitzgerald *et al.*, 2000). In den Vorversuchen wurde das Herz sofort mit 37,0° Celsius warmem Perfusat perfundiert. So behandelte Herzen zeigten teilweise eine initial gesteigerte Transsudatbildung, möglicherweise hervorgerufen durch Hitzeschock-induziertes Shedding bei zu warmem Perfusat.

Deshalb wurde bei den hier ausgewerteten Versuchen vor Präparationsbeginn lediglich das in der Zuleitung „stehende“ Perfusat komplett ausgetauscht und die Zuleitung luftblasenfrei gemacht. Die Perfusion des Herzen mit zu warmem und durch ausperlendes CO_2 alkalisiertem Perfusat wurde so verhindert. In der an die Präparation folgenden Adaptationszeit konnte sich das Herz auf die neuen Bedingungen bei langsam ansteigender Perfusatemperatur einstellen. Zu Versuchsbeginn wurde die Temperatur überprüft.

Nach der in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Präparation erfolgte ein Äquilibration über 15 Minuten. Danach wurden über fünf Minuten Transsudat und Effluat gesammelt (Basalwert).

In der Kontrollgruppe wurde in fünf Minuten langen Intervallen Transsudat und Effluat gesammelt, insgesamt 20 Minuten (Proben 1–4).

In den Gruppen ANP 10^{-10} M, ANP 10^{-11} M, BNP und CNP wurde mit dem Ende des Messintervalls für den Basalwert die Infusion der jeweiligen Substanz für

20 Minuten begonnen und über die Zeit der Infusion in fünf Minuten langen Intervallen Transsudat und Effluat gesammelt (Proben 1–4).

In den Gruppen mit einem Proteaseinhibitor (AT III, OP oder PI) wurde unmittelbar nach der Äquilibrierungsphase die Inhibitorsubstanz für 25 Minuten infundiert. In den ersten fünf Minuten wurde die Basalwertprobe entnommen, dann erfolgte die Infusion von ANP 10^{-10} M über 20 Minuten (Tabelle 4). Auch hier wurde in vier aufeinanderfolgenden Intervallen von jeweils fünf Minuten Dauer erneut Transsudat und Effluat gesammelt (Proben 1–4).

In den Gruppen OP und PI wurden in den fünf Minuten vor der Entnahme der Basalwertprobe, also noch während der Äquilibrierungsphase Transsudat und Effluat gesammelt, um den Effekt der Proteaseinhibitoren auf das Herzmodell abschätzen zu können. Diese entsprechen den Proben „vor Hemmstoffgabe“ bei den Purinbestimmungen (Tabelle 11).

Anschließend wurden bei allen Versuchsgruppen die Applikation der jeweiligen Substanz(-en) beendet und eine Infusion mit Hydroxyethylstärke 6% begonnen, die die Perfusatflussrate um 20 Prozent steigern sollte, um damit etwa ein Fünftel des kristalloiden Perfusats durch ein Kolloid zu ersetzen. Die rechnerische HES-Konzentration beträgt dann 1,2 Prozent. Nach 20 Minuten Infusion wurden für fünf weitere Minuten Transsudat und Effluat gesammelt (Probe 5). Bei der Gruppe PI und den Herzpräparaten für die Elektronenmikroskopie fand keine HES-Infusion statt.

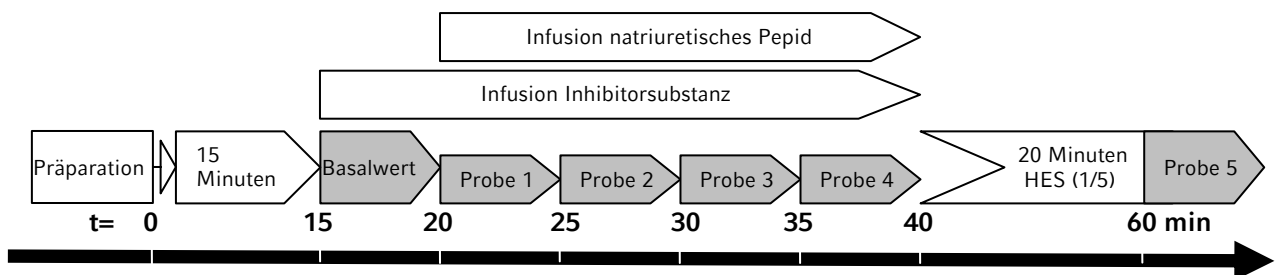


Abbildung 6: Grafische Darstellung des Versuchsprotokolls

In der Abbildung ist grafisch der Verlauf des Versuchs gekennzeichnet. Eingriffe in das Versuchssystem sind weiß gekennzeichnet, die Gewinnung von Proben grau.

2.3.6 Statistische Auswertung

Nach der experimentiellen Phase wurden die akquirierten Daten in SPSS für Windows Version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) konvertiert und analysiert. Statistische Auswertungen und Signifikanzen wurden mit dem Programm

SigmaStat für Windows Version 3.5 (Systat Software, Inc., Richmond, California, USA) berechnet. Vom Herzen abhängige Messgrößen wurden auf das Herzgewicht bezogen (in Gramm Trockengewicht). Für die Auswertung wurden die Mittelwerte (MW) mit Angabe des Standardfehlers (SEM) benützt, wenn nicht anders angegeben; die Darstellung erfolgt als $MW \pm SEM$.

Für normal verteilte Daten wurde die Varianzanalyse ANOVA und zur Analyse innerhalb der Versuchsgruppen post hoc die Student-Newman-Keuls-Methode verwendet.

Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als fünf Prozent ($p < 0,05$) angenommen. Bei hohem Signifikanzniveau wurde dies durch einen entsprechenden Hinweis ($p < 0,001$) vermerkt.

Für die Bestimmung der Konzentrationen abgespaltener Glykokalyx-Bestandteile stehen mit den beiden ELISA-Testkits Messinstrumente zur Verfügung, die auf einen Humanstandard von Heparansulfat bzw. Syndekan geeicht sind. Im Vergleich der einzelnen Testkits zeigten sich bei der Auswertung verschiedener Serien deutliche Differenzen. Diese Unterschiede in der absoluten Empfindlichkeit konnten durch Normierung auf einen in allen Testkits geprüften Basalwert korrigiert werden. Dazu wurden grafisch die Extinktionsmesswerte identischer Proben aufgetragen und durch Regression normierte Extinktionsgeraden erstellt, die dann zur Berechnung der Konzentrationen weiterer Proben herangezogen wurde. Zur Qualitätskontrolle der Regression wurden die Extinktionswerte als Histogramm dargestellt. Tabelle 5 zeigt die aus den Extinktionen berechneten Werte vor und nach dieser Korrektur.

Tabelle 5: Basalwerte für Syndekan vor und nach Normierung

Angegeben sind Messwerte der fünf verschiedenen ELISA-Testchargen für drei verschiedene Proben. In der Spalte links ist der absolute Messwert angegeben, in der daneben liegenden Spalte der normierte Wert, der mit zwei oder mehreren ELISA-Kits getestet wurde. Werte in ng/ml. n.d.= nicht durchgeführt.

	Basalwert Probe 47 (ANP 10^{-11} M)		Basalwert Probe 19 (ANP 10^{-10} M)		Basalwert Probe 24 (BNP 10^{-9} M)	
ELISA 1	n.d.		66,37	55,75	78,36	65,82
ELISA 2			817,54	89,19	1426,82	155,65
ELISA 3	248,60	96,46	n.d.		n.d.	
ELISA 4	479,99	98,59				
ELISA 5	179,12	96,73				

2.4. Bestimmung funktioneller Parameter

2.4.1 Transsudat

Das Koronare Effluat aus der Pulmonalkanüle und die vom Herz abtropfende Flüssigkeit (entsprechend dem Transsudat) wurden zu bestimmten Zeiten nach dem Versuchsprotokoll gesammelt, gewogen, sofort bei 4° Celsius gekühlt, in Reaktionsgefäße (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf; Zinser Analytic, Frankfurt) aliquotiert und bis zur Analyse bei -20° Celsius gefroren aufbewahrt.

2.4.2 Effluat

Zur Bestimmung der Menge des Effluats wurde der Abfluss aus der Pulmonalkanüle in einem geeigneten Behältnis gesammelt und analog zu 2.4.1 behandelt.

2.4.3 Ödembildung

Zu Ende des Versuchs wurde das Herzpräparat aus der Apparatur entfernt, die beiden Herzkammern eröffnet, mit Löschpapier ausgetupft und das Feuchtgewicht bestimmt. Nach 24 Stunden Trocknungsphase in einer 60° Celsius warmen Wärmekammer wurde das Trockengewicht bestimmt. Aus dem Feucht-Trocken-Verhältnis lässt sich auf die Ödembildung schließen.

Jeweils ein Herz jeder Untergruppe wurde für die elektronenmikroskopische Bildgebung mit Lanthanchlorid/Glutaraldehyd fixiert. Daher konnte bei diesen Präparaten kein Feucht-/Trockengewicht bestimmt werden.

2.5. Quantifizierung metabolischer Parameter

Ischämie und die damit einhergehende akute Hypoxie stimuliert die Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse. Im Versuchsablauf kann es zu Hypoxie kommen. Besonders kritisch ist die Zeit der warmen Ischämie während der Präparation. Daher wurden für Hypoxie relevante Metabolite (Becker, 1993) im koronarvenösen Effluat untersucht.

Purine (Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin, Guanosin) sind sensitive Marker für Hypoxie ebenso wie deren Abbauprodukt Harnsäure. Unter oxidativem Stress sind die Harnsäurespiegel vermindert relativ zu den Vorläuferpurinen.

2.5.1 Laktat

Die Messung der Laktatfreisetzung kann den durch jede Präparation gesetzten ischämischen Schaden quantifizieren, denn mit Zunahme der Dauer der ischämischen Präparation steigt die Laktatkonzentration an. Nach 20-minütiger Ischämie steigen die Laktatwerte beispielsweise bis zum Zehnfachen des Ausgangswerts an (Chappell *et al.*, 2009a). Deshalb wurden bei der Betrachtung der Laktatfreisetzung jene Versuche weggelassen, bei denen es während der Präparation und im Versuchsverlauf zu Auffälligkeiten kam, die *a priori* darauf schließen ließen, dass eine hohe und damit nicht vergleichbare Laktatkonzentration vorliegen würde. Die Versuche, die nicht an dieser Stelle gewertet wurden, sind im Anhang (Tabelle 18) aufgeführt. Entsprechendes gilt auch für die Messung von Harnsäure (Abschnitt 2.5.2) und Purinen (Abschnitt 2.5.3).

Zur Bestimmung der Laktatkonzentration wurden Proben des Koronareffluats (10 µl) mit Perchlorsäure (pH 2,0) angesäuert und mit einer Nucleosil® 100-5 NH₂ HPLC-Säule (Porenweite 100 Å, ID 4 mm, l 250 mm, Macherey-Nagel, Düren) chromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm.

2.5.2 Harnsäure

Die Bestimmung von Harnsäure erfolgte entsprechend Abschnitt 2.5.1.

Harnsäure wurde mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt (Becker, 1993). Dazu wurde eine Probe des Koronareffluats (10 µl) in einer mit C-18 Nucleosil (Partikelgröße 5 µm, Porenweite 100 Å) gepackten Säule (ID 4 mm, l 250 mm, Macherey-Nagel, Düren) analysiert. Die Detektion erfolgte bei 290 nm Wellenlänge.

2.5.3 Purine

Die Bestimmung von Gesamt-Purinen erfolgte entsprechend Abschnitt 2.5.1.

Die Gesamtmenge der Purine Adenosin, Inosin, Hypoxanthin und Xanthin wurden nach enzymatischer Umwandlung in Harnsäure *in toto* bestimmt. Die HPLC erfolgte mit einem System der Firma Merck/Hitachi, Darmstadt: Pumpe I-6200, UV-Detektor I-7400, Probengeber Waters 717+ Autosampler (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Die Detektion erfolgte bei 290 nm Wellenlänge.

2.6. Bestimmung der Konzentration von Hydroxyethylstärke

2.6.1 Hydroxyethylstärke-Präparat

In Vorversuchen wurde als Kolloid das Präparat HAES steril 6%® 200/0,5 (Fresenius Kabi, Bad Homburg) verwendet.

Versuche, die in die Auswertung eingingen, wurden ausschließlich mit dem Präparat Voluven® 6% Infusionslösung 130/0,4 in isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg) durchgeführt. Das mittlere Molekulargewicht der Hydroxyethylstärkemoleküle bei dieser Zubereitung beträgt 130 kDa bei einer molaren Substitution von ca. 0,4. Der pH-Wert des Präparats war mit 4,0–5,5 eingestellt, aufgrund einer niedrigen Titrationsazidität unter 1 Mol NaOH wurde nicht vortitriert.

2.6.2 Nachweis von Hydroxyethylstärke

Für die HES-Bestimmung wurde eine Hexokinase-Bestimmung in einer Modifikation nach Forster et al. (1981) gewählt. Zur Hydrolyse wurden 5 µl des Transsudats bzw. Effluats zusammen mit 250 µl einer Kalilauge-Lösung (35 %) vermischt und bei 100° Celsius für 45 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen und Zugabe von 7,5 ml Ethanol (100%) wurde die Suspension bei 4° Celsius inkubiert und anschließend kalt abzentrifugiert (1 Stunde bei 3.500 rpm, 4° Celsius, Zentrifuge 3.0R Heraeus). Der Überstand wurde verworfen, das übrig bleibende Pellet in 2,5 ml 2 molarer Salzsäure (HCl) aufgelöst und bei 100° Celsius für 120 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in ein 10 ml-Röhrchen überführt und mit 2,5 ml 2-molarer Natronlauge und Aqua bidest auf ein Volumen von 10 ml verdünnt.

500 µl dieser Lösung wurden dann in eine Messküvette überführt und mit 2 ml eines Substratgemisches (Puffer, ATP, NADPH, ADP: Gluco-quant®, Boehringer, Mannheim) vermischt und bei 340 nm die Nullwert-Extinktion im Photometer (Spectrophotometer Cary 100 Bio; Varian, Melbourne, Australia) gemessen. Nach Starten der Nachweisreaktion durch Zugabe von 40 µl von Hexokinase-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Gluco-quant®, Boehringer Mannheim) und Inkubation für zehn Minuten wurde die Extinktion bei 340 nm erneut gemessen und die Extinktionsdifferenz berechnet.

Mit derselben Methode wurden auch HES-Standards (1,2 g/dl und 2,4 g/dl) behandelt.

Die Extinktionsdifferenz (ΔE) ist direkt proportional zur HES-Konzentration. In der Probe errechnet sich dann unter Verwendung der Standardkonzentration (c_{STD}) die HES-Konzentration (c_{HES}) wie folgt:

$$c_{HES} = c_{STD} \cdot \Delta E_{Probe} / \Delta E_{Standard}$$

In Vorversuchen (Rehm *et al.*, 2004) betrug die Standardabweichung bei 200 *in-vitro*-Messungen mit verschiedenen bekannten HES-Konzentrationen in Plasmaproben $\pm 0,016$ g/dl.

2.7. Nachweis von Heparansulfat und Syndekan-1

Die Bestimmung von biochemischen Markern Heparansulfat und Syndekan erfolgte freundlicherweise durch das Forschungslabor an der Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum der Universität München, am Campus Großhadern.

2.7.1 Nachweis von Heparansulfat

Für die Bestimmung von Heparansulfat im Koronarvenösen Effluat wurde ein ELISA Nachweis-Kit (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) analog dem in Abschnitt 2.7.2 beschriebenen Verfahren verwendet. Der Messbereich lag hier bei 0,25–8 $\mu\text{g/ml}$, bei darüber liegenden Konzentrationen mussten die Proben verdünnt und erneut gemessen werden. Für die Photometrie wurde Licht einer Wellenlänge von 620 nm benutzt.

2.7.2 Nachweis von Syndekan-1 (CD138)

Der sCD138 Kit (Diacclone Research, Besançon, Frankreich) ist ein Festphasen-Sandwich-ELISA. Ein an der Mikrotiterplatte gebundener, spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen CD138 bindet das Antigen. Daran bindet ein Detektions-Antikörper, der das Enzym Streptavidin-Peroxidase enthält, das bei dem Chromogen Tetramethylbenzidin einen Farbumschlag nach gelb induziert. Dieser wird photometrisch ($\lambda = 450$ nm) quantifiziert. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration von Syndekan-1 im untersuchten Medium in einem Bereich von 8 bis 256 ng/ml. Über mehrere Standards, sowie Negativ- und Positivkontrollen lässt sich eine Eichgerade festlegen, auf der die Konzentration von Syndekan-1 abgelesen werden kann (Dore *et al.*, 1998).

2.8. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Darstellung der Glykokalyx kam die Methode nach (Vogel *et al.*, 2000) zum Einsatz. Am Ende des jeweiligen Perfusionsprotokolls wurde bei jeweils einem Herz jeder Versuchsgruppe die Aorta mit einer Lanthan-haltigen Fixierlösung perfundiert, deren Zusammensetzung in Tabelle 6 aufgeführt ist. Sofort kommt es darunter zum Herzstillstand. Lanthan ist ein trivalentes Kation, das an negativ geladene Glykoproteine und damit auch an der Glykokalyx bindet.

Sofort nach der Perfusionsfixierung wurde das Herz aus der Apparatur entfernt und mehrere (4–6) kleine Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 0,5–1 mm aus der Wand des linken Ventrikels exzidiert. Nach einer weiteren Fixierungsphase von 2 Stunden bei 20° Celsius in demselben Medium wurden die Gewebeproben in eine Waschlösung (vgl. Tabelle 6; Glutaraldehyd wurde dabei durch Aqua bidest ersetzt) überführt und dort über Nacht aufbewahrt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Fixierlösung für die Lanthanfärbung nach Vogel *et al.*

Verbindung	Summenformel	Konzentration	Hersteller
Glutaraldehyd, 25% in H ₂ O	C ₅ H ₈ O ₂	200 mM	Sigma, St. Louis, MO, USA
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	20 mM	Merck, Darmstadt
Na-Cacodylat-Puffer	NaC ₂ H ₆ AsO ₂	0,1 M	Merck, Darmstadt
Lanthan(III)-nitrat	La(NO ₃) ₃ x 6H ₂ O	45 mM	Sigma, St. Louis, MO, USA

Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebeproben mit einer wässrigen Lösung von NaOH (0,02 N, Merck, Darmstadt) und Saccharose (2,4 %) für eine Stunde gespült. Zur Erhöhung des Gewebekontrasts erfolgte ein weiterer Spülgang mit 2% Osmiumtetroxid und 2% Lanthannitrat (beides Sigma, St. Louis, Mo, USA) für zwei Stunden. Dann wurden die Proben dehydriert durch Ethanol und in Araldit, einem Epoxyd-Harz, eingebettet. Die Schnitte (Dicke ca. 45 nm) wurden mit einem Reichart Ultramikrotom gefertigt und mit Bleizitrat und Uranylazetat für die Elektronenmikroskopie gefärbt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Philips CM 10, Aachen) wurden an der anatomischen Anstalt der LMU erstellt (AG Prof. Dr. Ulrich Welsch). Von den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Schwarz-Weiß-Bilder in analoger Technik von je rund 50 Kapillaren hergestellt. Kollabierte oder beschädigte Gefäße wurden nicht ausgewertet, weil nicht sicher davon ausgegangen werden konnte, dass diese von der Fixierlösung auch erreicht worden waren.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 71 Versuche durchgeführt, wovon 49 (69 %) in die Auswertung eingingen. Begonnene und abgebrochene Versuche bzw. Vorversuche wurden nicht ausgewertet (n = 22). Gründe für den Abbruch des Versuchs waren

- basal hohe Transsudatbildung (> 7 g Transsudat pro g Herzgewicht/ 5 min),
- anatomische Varianten, die die Kanülierung der Gefäße verhinderten,
- bis zum Ende der Äquilibrierungsphase andauernde, persistierende Herzrhythmusstörungen, oder
- primäres Rechtsherzversagen (Blähung des rechten Herzens).

Insgesamt waren vier verschiedene Präparatoren mit langjähriger Erfahrung beteiligt. Im Mittel dauerte die Präparation vom Nackenschlag bis zum Perfusionsbeginn 2:37 Minuten (\pm 1:12 Minuten). Dies entspricht der Summe aus warmer (bis zur Eröffnung des Thorax) und kalter (durch Kühlung mit kalter NaCl) Ischämie-Zeit. Die Gesamtdauer der Fein-Präparation bis zum Beginn der Äquilibrierungsphase betrug im Mittel 11:15 Minuten (\pm 5:03 Minuten).

3.1. Versuchstiere

Die Versuchstiere wogen zwischen 188 und 344 Gramm, (265 ± 42 Gramm). Das kardiale Trockengewicht korreliert signifikant ($p < 0,01$) mit dem Tiergewicht (2-seitig nach Pearson). Die gemessenen Gewichte der verschiedenen Versuchsgruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 7: Übersicht über die gemessenen Herz- und Tiergewichte

	N	Gewicht trocken [mg]	Gewicht feucht [mg]	Tiergewicht [g]
Kontrolle	7	167 (\pm 5,9)	1.177,2 (\pm 46)	248,9 (\pm 13,3)
ANP 10^{-10} M	6	171,2 (\pm 13,1)	1.244,8 (\pm 131)	267,3 (\pm 20,4)
ANP 10^{-11} M	7	153,1 (\pm 3,8)	1.109,3 (\pm 31)	241,6 (\pm 5,6)
BNP	6	163,7 (\pm 13,1)	1.184,5 (\pm 90)	258,5 (\pm 17,5)
CNP	7	175,9 (\pm 9,9)	1.288,7 (\pm 96)	272,7 (\pm 16,7)
ANP+AT III	7	149,7 (\pm 11,4)	1.118,4 (\pm 114)	248,9 (\pm 14,5)
ANP+PI	4	155,8 (\pm 9,5)	1.107 (\pm 143)	274 (\pm 13,7)
ANP+OP	5	149,6 (\pm 11,4)	1.176,4 (\pm 69)	266,4 (\pm 13,6)
Gesamt	49	161,2 (\pm 3,6)	1.175,5 (\pm 31)	258,5 (\pm 5,2)

3.2. Perfusat

Die gebrauchsfertige Perfusionslösung wurde an jedem Versuchstag hinsichtlich der in Tabelle 8 aufgeführten Parameter untersucht und die Zusammensetzung des Perfusats gegebenenfalls angepasst.

Tabelle 8: Übersicht über Elektrolyt- und Oxymetriewerte der Perfusatlösung

In der Tabelle sind die Messwerte für das Perfusat aufgeführt (Mittelwert \pm Standardfehler; n=16).

Parameter	Messwert	Einheit
pH	7,47 (\pm 0,01)	–
PO ₂	431 (\pm 6,35)	mmHg
PCO ₂	27,4 (\pm 1,3)	
K ⁺	4,74 (\pm 0,03)	mmol/l
Na ⁺	136,9 (\pm 1,2)	
Cl ⁻	125,3 (\pm 0,7)	
Ca ²⁺	1,08 (\pm 0,02)	
Glukose	5,1 (\pm 0,1)	
HCO ₃ ⁻	21,1 (\pm 0,5)	

3.3. Versuchsablauf

Die Herzen erlangten bei der Perfusion mit 37° Celsius warmer Krebs-Henseleit-Lösung innerhalb weniger Minuten einen regelmäßigen Sinusrhythmus. Die Kontraktionskraft der beiden Ventrikel war ausreichend, um einen Rückstau des Perfusats in die Vorhöfe zu verhindern.

Bei der Infusion des Proteaseinhibitorenmixes kam es zu einem massiven Linksherzversagen mit Blähung des linken Vorhofs und enorm gesteigerter Transsudatformation bis hin zu einem Rückgang des Koronarflusses unter den Wert der Transsudatformation. Bei einem Versuch wurde eine Schlierenbildung im aortalen Zulauf beobachtet, vereinbar mit dem Ausfällen von Teilen des Proteaseinhibitorengemisches, der auch so in der Produktinformation beschrieben wird. Konsekutiv kam es zur Okklusion der Mikrogefäße durch die ausgefallenen Partikel.

Die mögliche Induktion von Mikroembolien schränkt die Aussagekraft der Messwerte für metabolische Parameter (Tabelle 14), Koronarfluss und Transsudatbildung in dieser Versuchsgruppe stark ein. Dennoch wurden diese Proben der Analyse von Glykokalyxbestandteilen zugeführt, weil zumindest die qualitative Bestimmung auch in diesem Versuchsansatz sinnvoll erschien.

3.4. Funktionelle Parameter

3.4.1 Transsudat

Der Transsudatfluss 15 Minuten nach der Präparation reichte von 1,02 bis 6,26 g/5 Minuten (Mittelwert $3,01 \pm 0,2$). Der Basalwert wird von der Güte der Präparation, dem Tiergewicht etc. bestimmt. Die Transsudatbildung hängt auch unter Kontrollbedingungen stark vom Herzgewicht ab. Trotz Normierung auf das Herzgewicht zeigten kleine Herzen junger Versuchstiere hohe basale Transsudatbildung, während Herzen älterer und damit größerer Tiere wesentlich geringere Mengen an Transsudat bildeten. Daher wurde streng darauf geachtet, dass die Tiergewichte sich nicht zwischen den Gruppen unterschieden (Tabelle 7). Zudem wurde die Transsudatbildung auf den individuellen Basalwert eines jeden Herzen bezogen (Tabelle 9). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Basalwerten der einzelnen Gruppen. In der Kontrollgruppe steigerte sich die Transsudatbildung von der Äquilibrationsphase bis zum Ende des Versuchs um acht Prozent. Die Veränderung der Transsudatmenge wurde grafisch auf den jeweiligen Basalwert normiert ($=1$; Abbildung 7 und Abbildung 8). ANP verursachte in der höheren Konzentration einen signifikanten, zunächst kontinuierlichen Anstieg der Transsudatbildung bis zum 15-Minuten Wert. Nach weiteren fünf Minuten kam es unter ANP 10^{-10} M letztlich zur Verdopplung des Basalwerts. Unter BNP wurde mit einer Transsudatsteigerung um 107 Prozent ein dem ANP vergleichbarer Anstieg erzielt. Unter CNP erfolgte ein Anstieg um gut 70 Prozent nach 20 Minuten. ANP in einer 10-fach niedrigeren Konzentration zeigte einen weniger starken, aber stets kontinuierlichen, signifikanten Anstieg um 45 Prozent nach 20 Minuten.

Tabelle 9: Werte des Transsudatflusses in einzelnen Versuchsgruppen über 20 Minuten

Angaben in g/min/g; \pm SEM (* = $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrolle)

Gruppe	n	Basalwert	5 min	10 min	15 min	20 min
Kontrolle	7	3,88 ($\pm 0,7$)	4,02 ($\pm 0,7$)	4,06 ($\pm 0,7$)	4,19 ($\pm 0,7$)	4,08 ($\pm 0,7$)
ANP 10^{-10} M	6	4,27 ($\pm 0,9$)	5,25 ($\pm 1,3$)	6,43 ($\pm 1,9$)	6,88 ($\pm 2,1$) *	8,56 ($\pm 2,0$) *
ANP 10^{-11} M	7	3,31 ($\pm 0,8$)	3,76 ($\pm 0,8$)	3,99 ($\pm 0,7$)	4,25 ($\pm 0,7$)	4,46 ($\pm 0,7$) *
BNP	6	2,35 ($\pm 0,3$)	3,04 ($\pm 0,3$)	4,06 ($\pm 0,7$)	4,72 ($\pm 0,8$)	4,95 ($\pm 0,8$) *
CNP	7	2,85 ($\pm 0,2$)	3,51 ($\pm 0,4$)	4,30 ($\pm 1,0$)	4,76 ($\pm 1,3$)	4,86 ($\pm 1,3$) *
ANP + AT III	7	3,18 ($\pm 0,3$)	3,45 ($\pm 0,3$)	4,28 ($\pm 0,3$)	5,01 ($\pm 0,4$)	5,64 ($\pm 0,4$)
ANP + OP	4	2,79 ($\pm 0,7$)	4,16 ($\pm 0,8$)	8,09 ($\pm 1,9$)*	8,48 ($\pm 1,6$) *	8,41 ($\pm 1,3$) *
ANP + PI	5	2,91 ($\pm 0,2$)	4,34 ($\pm 0,9$)	6,40 ($\pm 2,1$)	6,91 ($\pm 2,1$)	7,03 ($\pm 2,2$) *

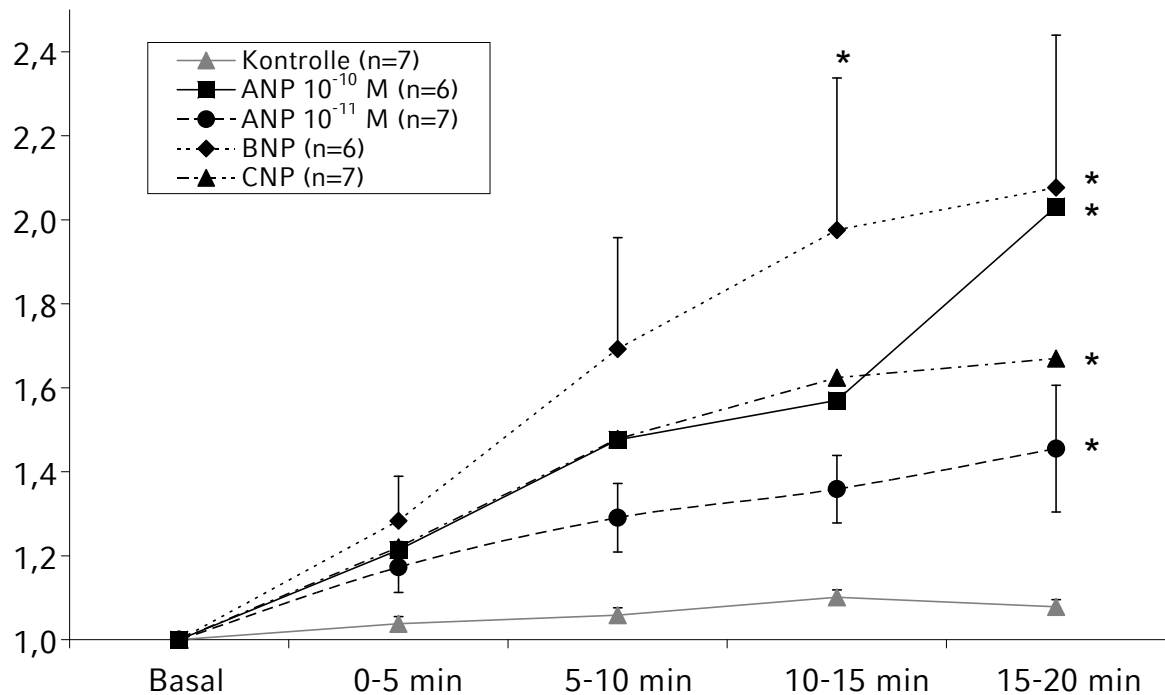


Abbildung 7: Normierte Steigerung der Transsudatmenge bei Zugabe natriuretischer Peptide

In der Abbildung ist grafisch die Entwicklung von Transsudat in Abhängigkeit von der Zeit unter Kontrollbedingungen und unter Infusion von natriuretischen Peptiden aufgezeigt. Die Werte wurden auf den jeweiligen Basalwert des einzelnen Versuchs normiert (Basal = 1). * = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe; ± SEM.

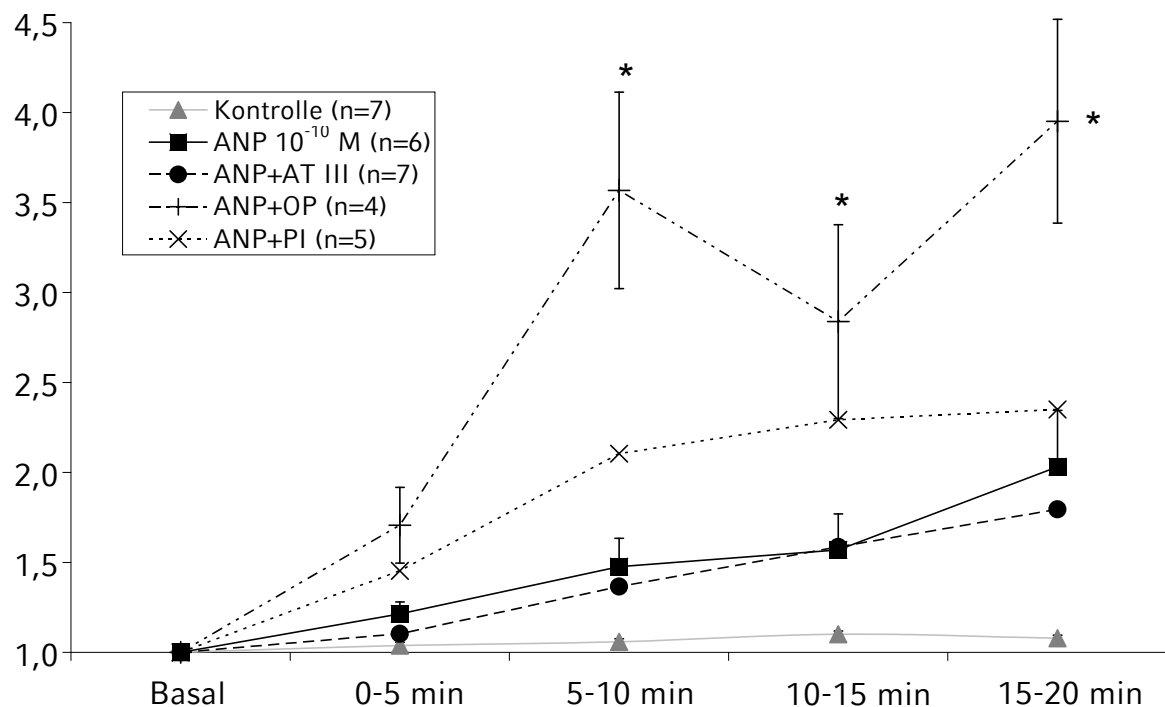


Abbildung 8: Normierte Steigerung der Transsudatmenge bei Zugabe von Inhibitorsubstanzen

In der Abbildung ist grafisch die Entwicklung von Transsudat unter Infusion von ANP 10⁻¹⁰ M und Inhibitorsubstanzen aufgezeigt. Die Werte wurden auf den jeweiligen Basalwert des einzelnen Versuchs normiert (Basal = 1). * = p < 0,05 gegen Kontrollgruppe; ± SEM.

3.4.2 Effluat

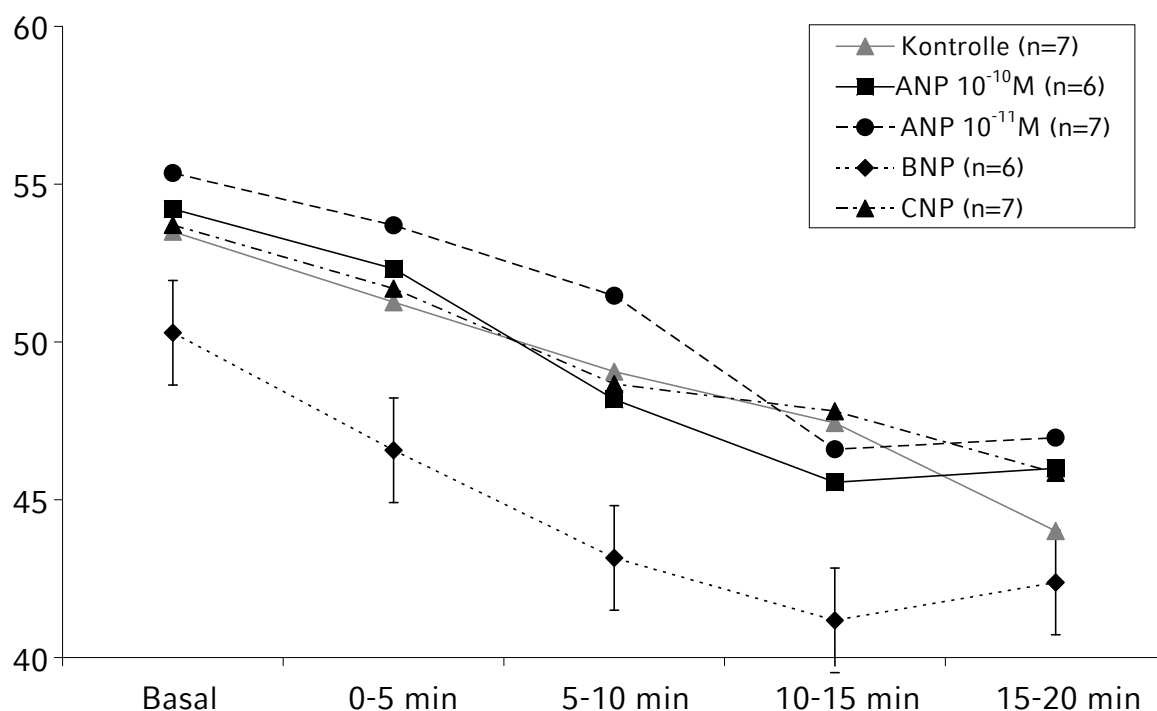


Abbildung 9: Veränderung der Effluatmenge unter Zugabe natriuretischer Peptide

In der Abbildung ist grafisch die Entwicklung von Effluat bezogen auf das Herzgewicht in der Kontrollgruppe und unter Infusion von natriuretischen Peptiden aufgezeigt. Werte in g/min/g Herztrockengewicht. \pm SEM.

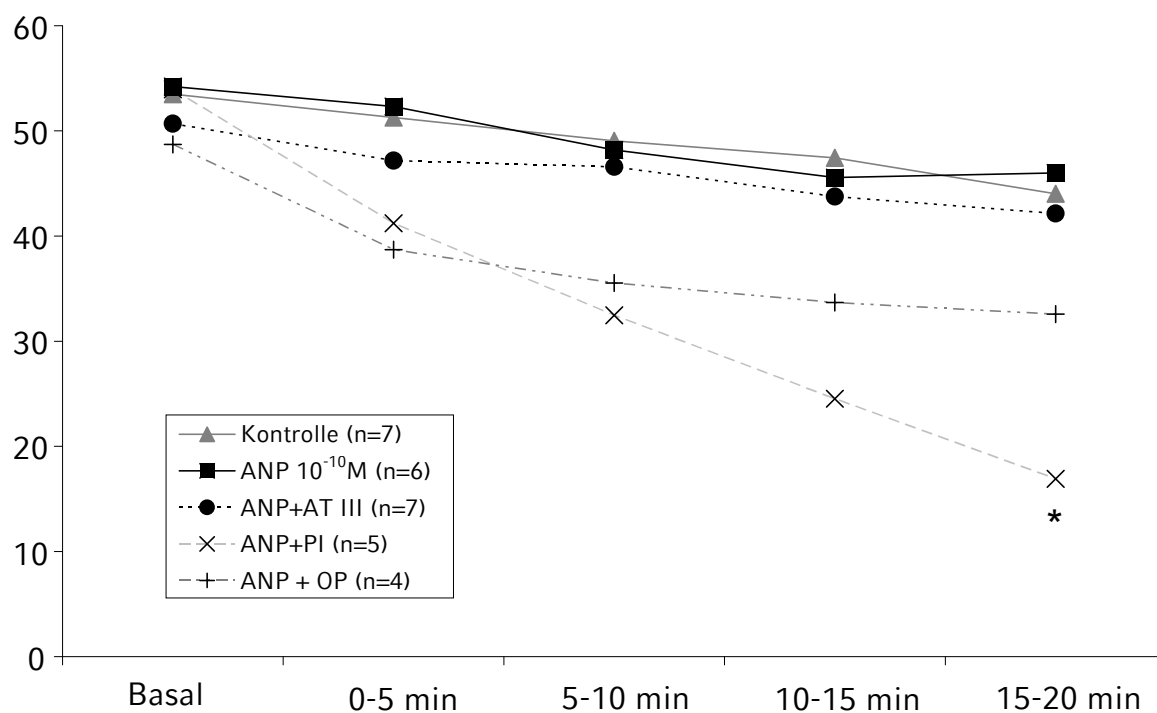


Abbildung 10: Veränderung der Effluatmenge im Vergleich der Inhibitor-Versuchsgruppen

In der Abbildung ist grafisch die Entwicklung von Effluat bezogen auf das Herzgewicht unter Infusion von natriuretischen Peptiden und Inhibitorsubstanzen aufgezeigt. Werte in g/min/g Herztrockengewicht. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle und ANP10⁻¹⁰M.

Der koronarvenöse Effluatfluss nahm im Verlauf des Versuchs gleichförmig etwa um ein Fünftel ab. Die Applikation natriuretischer Peptide hatte auf diese Entwicklung keinen Einfluss. Lediglich bei der Gabe des Protease-Inhibitorgemisches (PI) zeigte sich eine signifikante stärkere Abnahme um 70 Prozent.

3.4.3 Ödembildung

Die Untersuchung der Ödembildung der Herzen einzelner Versuchsgruppen (siehe auch Tabelle 7) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Tabelle 10 listet die Feucht-/Trocken-Gewichtsverhältnisse auf. Das Verhältnis lag bei Herzen nach HES-Perfusion im Bereich von 7,2–7,6. Herzen, die in einer Voruntersuchung sofort nach der Explantation aus dem Versuchstier getrocknet wurden, wiesen ein Verhältnis von ca. 4,5 auf (nicht aufgezeigt).

Auffallend waren die Werte der beiden Inhibitorgruppen mit OP bzw. PI, die mit ihrem Feucht-/Trockenverhältnis die Extremwerte von 7,06 und 7,93 beschreiben, obwohl in beiden Gruppen keine HES-Perfusion durchgeführt wurde. AT III hatte keinen signifikanten Effekt auf die Ödembildung

Tabelle 10: Ödembildung in einzelnen Versuchsgruppen

a) In diesen Gruppen konnte jeweils ein Herz wegen der Fixierung für die Elektronenmikroskopie nicht mit HES perfundiert werden und wurde daher von der Analyse ausgeschlossen;
b) in diesen Gruppen wurde keine HES-Perfusion durchgeführt; Werte \pm SEM.

Gruppe	n	Verhältnis Feucht-/Trockengewicht
Kontrolle a)	6	7,30 (\pm 0,34)
ANP 10^{-10} M a)	5	7,54 (\pm 0,30)
ANP 10^{-11} M a)	6	7,25 (\pm 0,14)
BNP a)	5	7,23 (\pm 0,26)
CNP a)	6	7,57 (\pm 0,18)
ANP + AT III a)	6	7,33 (\pm 0,34)
ANP + OP b)	4	7,06 (\pm 0,65)
ANP + PI b)	5	7,93 (\pm 0,41)

3.5. Quantifizierung metabolischer Parameter

3.5.1 Laktat

Tabelle 11: Laktatfreisetzung in den Versuchsgruppen (* = $p < 0,05$ vs. Basalwert)

Gruppe	n	Laktat-Freisetzung [$\mu\text{mol/min/g}$]	
		Basalwert	nach 20 Minuten
Kontrolle	7	0,90 ($\pm 0,49$)	1,15 ($\pm 0,48$)
ANP 10^{-10} M	5	0,96 ($\pm 0,36$)	1,72 ($\pm 0,40$) *
ANP 10^{-11} M	6	0,67 ($\pm 0,11$)	1,51 ($\pm 0,71$) *
BNP	5	0,61 ($\pm 0,08$)	1,39 ($\pm 0,33$) *
CNP	5	0,87 ($\pm 0,21$)	1,64 ($\pm 0,62$) *
ANP + AT III	5	0,73 ($\pm 0,48$)	1,61 ($\pm 0,76$)
ANP + OP	5	0,71 ($\pm 0,39$)	1,67 ($\pm 0,70$) *
ANP + PI	3	1,12 ($\pm 0,55$)	1,95 ($\pm 0,92$)

In allen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, ist ein Anstieg der Laktatproduktion während der 20-minütigen Infusionsphasen natriuretischer Peptide zu beobachten.

Bei den Untergruppen Ortho-Phenanthrolin (OP) und dem Proteaseinhibitoren-Mix (PI) wurden vor Beginn der Infusion des Hemmstoffes ($t = 5\text{--}15$ min) und damit während der 15-minütigen Anpassungsphase des Herzpräparats zusätzlich Proben aus dem Koronareffluat genommen, um die Auswirkungen des Hemmstoffs auf die metabolische Situation des Herzens zu quantifizieren. Die Infusion von Ortho-Phenanthrolin hatte keine kurzfristig erfassbaren Auswirkungen auf die Laktat-Freisetzung, während sich nach Gabe von Protease-Inhibitor-Mix die Laktatbildung signifikant erhöhte (Tabelle 12).

Tabelle 12: Auswirkung der Inhibitoren auf die Laktatfreisetzung

(* $p < 0,05$ vs. Basalwert; ** $p < 0,01$ vs. Wert vor Hemmstoffgabe)

Gruppe	n	Laktat-Freisetzung [$\mu\text{mol/min/g}$]		
		vor Hemmstoffgabe	nach 5' Hemmstoffgabe	nach 20' ANP
ANP + OP	5	0,72 ($\pm 0,55$)	0,71 ($\pm 0,39$)	1,67 ($\pm 0,70$)*
ANP + PI	3	0,81 ($\pm 0,77$)	1,12 ($\pm 0,55$) **	1,95 ($\pm 0,92$)

3.5.2 Harnsäure

Analog zu 3.5.1 wurde auch Harnsäure im Effluat bestimmt. Im Vergleich zu Laktat waren keine einheitlichen Veränderungen bei der Infusion natriuretischer Peptide zu verzeichnen. Bei einigen Gruppen kam es sogar zum Rückgang der Harnsäureproduktion. Deutlich und signifikant ist lediglich der Anstieg der Harnsäurefreisetzung in der Gruppe mit AT III als Inhibitor (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Harnsäurefreisetzung in den Versuchsgruppen
(* = $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrolle)

Gruppe	n	Harnsäure-Freisetzung [nmol/min/g]	
		Basalwert	nach 20 Minuten
Kontrolle	7	2,58 ($\pm 0,70$)	2,03 ($\pm 0,84$)
ANP 10^{-10} M	5	3,21 ($\pm 0,99$)	3,17 ($\pm 0,81$) *
ANP 10^{-11} M	6	2,18 ($\pm 0,51$)	2,63 ($\pm 0,65$)
BNP	5	2,43 ($\pm 0,64$)	2,66 ($\pm 0,49$)
CNP	5	3,47 ($\pm 0,74$)	3,03 ($\pm 1,04$)
ANP + AT III	5	2,65 ($\pm 0,83$)	3,18 ($\pm 0,46$) *
ANP + OP	5	3,42 ($\pm 1,00$)	3,09 ($\pm 0,88$)
ANP + PI	4	2,44 ($\pm 0,93$)	2,02 ($\pm 1,00$)

Anders als bei Laktat neigte die Harnsäurefreisetzung nach Gabe von Ortho-Phenanthrolin und Proteaseinhibitorenmix dazu leicht abzunehmen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Auswirkung der Inhibitoren auf die Harnsäurefreisetzung

Gruppe	n	Harnsäure-Freisetzung [nmol/min/g]		
		vor Hemmstoffgabe	nach 5' Hemmstoffgabe	nach 20' ANP
ANP + OP	5	2,80 ($\pm 0,98$)	3,42 ($\pm 1,00$)	3,09 ($\pm 0,88$)
ANP + PI	4	2,51 ($\pm 1,17$)	2,44 ($\pm 0,93$)	2,02 ($\pm 1,00$)

3.5.3 Purine

Die Veränderung der Purinwerte vor und nach 20-minütiger Perfusion mit natriuretischen Peptiden war uneinheitlich. In den Gruppen ANP 10^{-10} M und bei den Inhibitoren AT III und PI kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Purinfreisetzung gegenüber dem Kontrollwert, der Anstieg selbst war jedoch jeweils nicht statistisch signifikant. Unter CNP und ANP + OP kam es zu einem Rückgang der Purinfreisetzung (statistisch nicht signifikant) wie bei dem Wert der Kontrollgruppe.

Tabelle 15: Freisetzung von Purinen in den Versuchsgruppen(* = $p < 0,05$ im Vergleich zu Basalwert)

Gruppe	n	Purin-Freisetzung [nmol/min/g]	
		Basalwert	nach 20 Minuten
Kontrolle	7	6,00 ($\pm 1,62$)	3,91 ($\pm 0,7$)
ANP 10^{-10} M	6	6,21 ($\pm 1,32$)	6,78 ($\pm 0,61$)*
ANP 10^{-11} M	6	4,94 ($\pm 0,34$)	6,09 ($\pm 0,9$)
BNP	5	4,12 ($\pm 0,47$)	6,28 ($\pm 0,87$)
CNP	7	6,89 ($\pm 0,91$)	4,70 ($\pm 0,65$)
ANP + AT III	7	6,28 ($\pm 1,38$)	9,92 ($\pm 2,26$)*
ANP + OP	5	8,81 ($\pm 2,35$)	5,09 ($\pm 0,29$)
ANP + PI	3	5,00 ($\pm 1,1$)	10,54 ($\pm 3,63$)*

Nach Gabe der Proteaseinhibitorstoffen OP und PI kam es zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Freisetzung von Purinen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Auswirkung der Inhibitoren auf die Harnsäurefreisetzung

Gruppe	n	Purin-Freisetzung [nmol/min/g]		
		vor Hemmstoffgabe	nach 5' Hemmstoffgabe	nach 20' ANP
ANP + OP	5	5,39 ($\pm 1,19$)	8,81 ($\pm 2,35$)	5,09 ($\pm 0,29$)
ANP + PI	3	4,77 ($\pm 2,79$)	5,00 ($\pm 1,1$)	10,54 ($\pm 3,63$)

3.6. Extravasation von Hydroxyethylstärke

In einigen Versuchsgruppen wurde nach der 20-minütigen Infusionsdauer für weitere 20 Minuten ein Fünftel des Perfusats durch eine sechsprozentige Hydroxyethylstärke (HES)-Lösung ersetzt. Damit beträgt die rechnerische intravasale HES-Konzentration 1,2 Prozent. Die mittlere gemessene HES-Konzentration im Effluat betrug 1,15 ($\pm 0,07$) g/dl.

Tabelle 17: Netto-Extravasation von Hydroxyethylstärke in einzelnen Versuchsgruppen

Die Tabelle zeigt die gemessenen Konzentrationen von HES im Transsudat und Effluat (g/dl) und die während der letzten fünf Minuten ausgeschiedene Menge an HES während der 25-minütigen HES-Perfusion. # = $p < 0,01$ im Vergleich der ANP-Gruppen; * = $p < 0,05$ gegen Kontrolle; \pm SEM

Gruppe	n	g HES/dl im Effluat	g HES/dl im Transsudat	Extravasation [mg HES/5 min]
Kontrolle	6	0,97 ($\pm 0,07$)	0,32 ($\pm 0,12$)	10,4 ($\pm 3,5$)
ANP 10^{-10} M	5	0,92 ($\pm 0,10$) #	1,00 ($\pm 0,05$) *#	109,1 ($\pm 29,5$) *
ANP 10^{-11} M	6	1,50 ($\pm 0,06$) *#	1,40 ($\pm 0,08$) * #	41,8 ($\pm 8,0$)
BNP	4	1,38 ($\pm 0,13$) *	1,01 ($\pm 0,15$) *	34,5 ($\pm 16,0$)
CNP	6	1,03 ($\pm 0,07$)	1,07 ($\pm 0,12$) *	69,9 ($\pm 25,4$)
ANP + AT III	3	1,65 ($\pm 0,02$) *	1,69 ($\pm 0,03$) *	49,7 ($\pm 0,73$) *

Während in der Kontrollgruppe die HES-Konzentration im Transsudat mit 0,32 g/dl etwa ein Drittel der intravasal gemessenen HES-Konzentration betrug, waren die HES-Konzentrationen im Transsudat in allen Versuchsgruppen deutlich erhöht. In der Versuchsgruppe mit ANP in hoher Konzentration überstieg die HES-Konzentration im Transsudat sogar deutlich die des Perfusats. Zusätzlich wurde die Gesamtmenge des während fünf Minuten netto filtrierte HES berechnet. Hier kam es in allen Gruppen zu einer signifikanten Extravasation von HES.

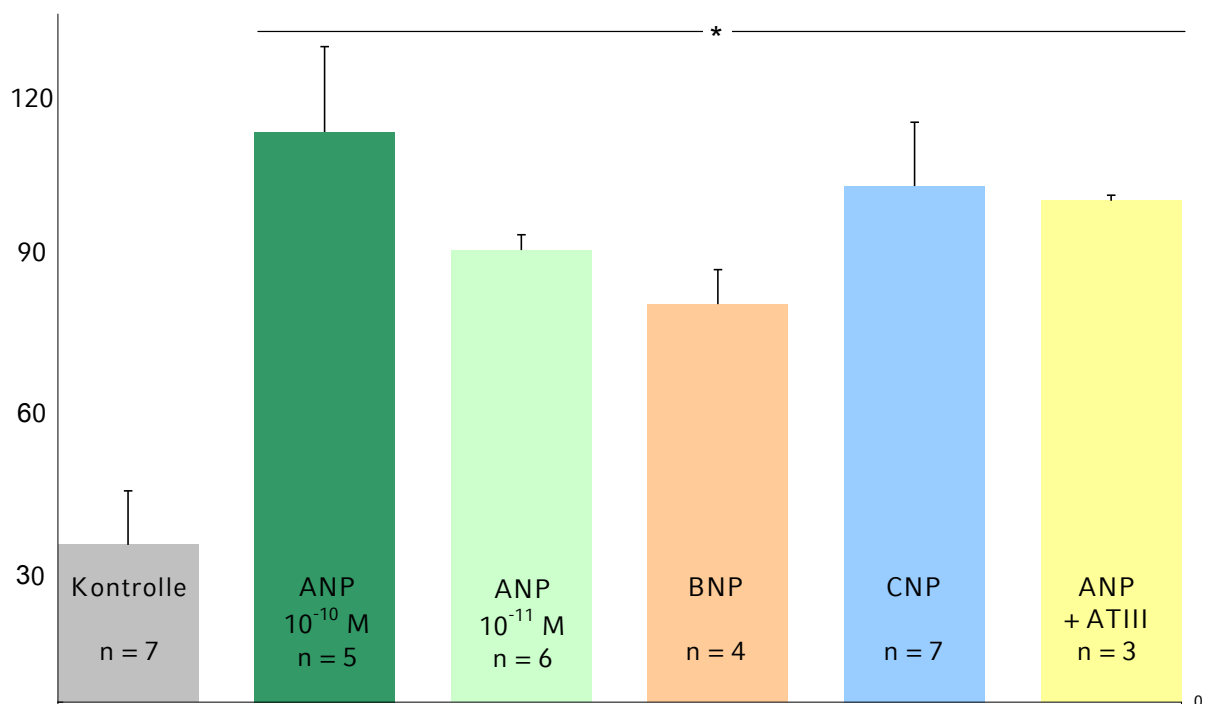


Abbildung 11: Konzentration von HES im Transsudat im Vergleich zur Konzentration im Effluat
In der Abbildung ist grafisch das Verhältnis der HES-Konzentration im Transsudat zur HES-Konzentration im Effluat dargestellt (Angaben in Prozent, \pm SEM; * = $p < 0,05$ gegen Kontrolle).

3.7. Koronarvenöse Abgabe von Glykokalyx-Bestandteilen

3.7.1 Heparansulfat

Bei der Untersuchung von Heparansulfat im Effluat kam es unter ANP in einer Konzentration von 10^{-10} M ab der fünften Minute zu einer verstärkten maximalen Freisetzung, während der Wert in den ersten fünf Minuten der Perfusion noch der mittleren basalen Freisetzung entsprach (Abbildung 12), die bei $1,51 \mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ lag. Bei ANP in einer Konzentration von 10^{-11} M wurde bereits mit Beginn der ANP Perfusion ein tendenzieller Anstieg beobachtet, der aber um nahezu die Hälfte unter dem Maximalwert von ANP in höherer Konzentration zurückblieb (Abbildung 12).

Nach 20-minütiger Perfusion waren keine Unterschiede zwischen den beiden ANP-Konzentrationen erkennbar. Es lagen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Rate der Heparansulfat-Abgabe vor. Die gesamte innerhalb der 20-minütigen Applikationsphase freigesetzte Menge an Heparansulfat ist in Abbildung 13 dargestellt. Statistisch signifikant war nur der Effekt von ANP in der Konzentration von 10^{-10} M mit dem Effekt einer Steigerung der Abgabe um etwa den Faktor 2,5 gegen Kontrolle. Unter Gabe von CNP kam es nach 15–20 Minuten zu einer signifikanten Heparansulfatfreisetzung (Abbildung 14).

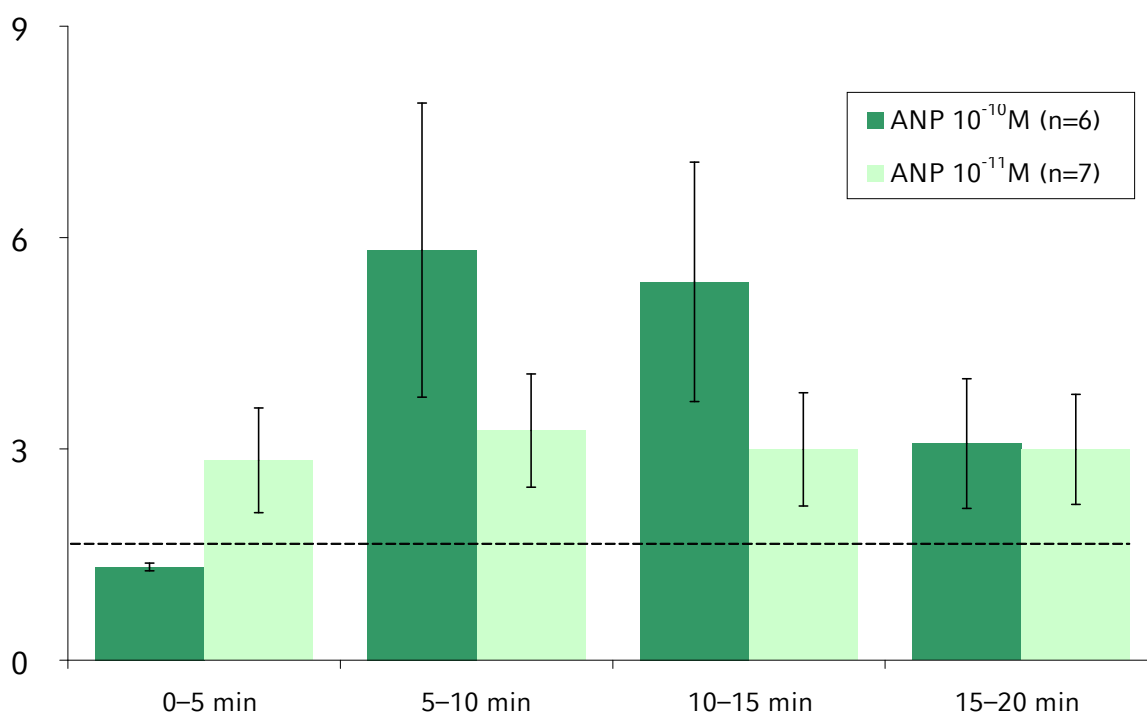


Abbildung 12: Freisetzung von Heparansulfat im Zeitverlauf

In der Abbildung ist grafisch die Freisetzung von Heparansulfat während 20-minütiger Infusion von ANP 10^{-10} M oder 10^{-11} M aufgezeigt. Die mittlere basale Freisetzung beträgt $1,51 \mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ und wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. Werte in $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$; \pm SEM.

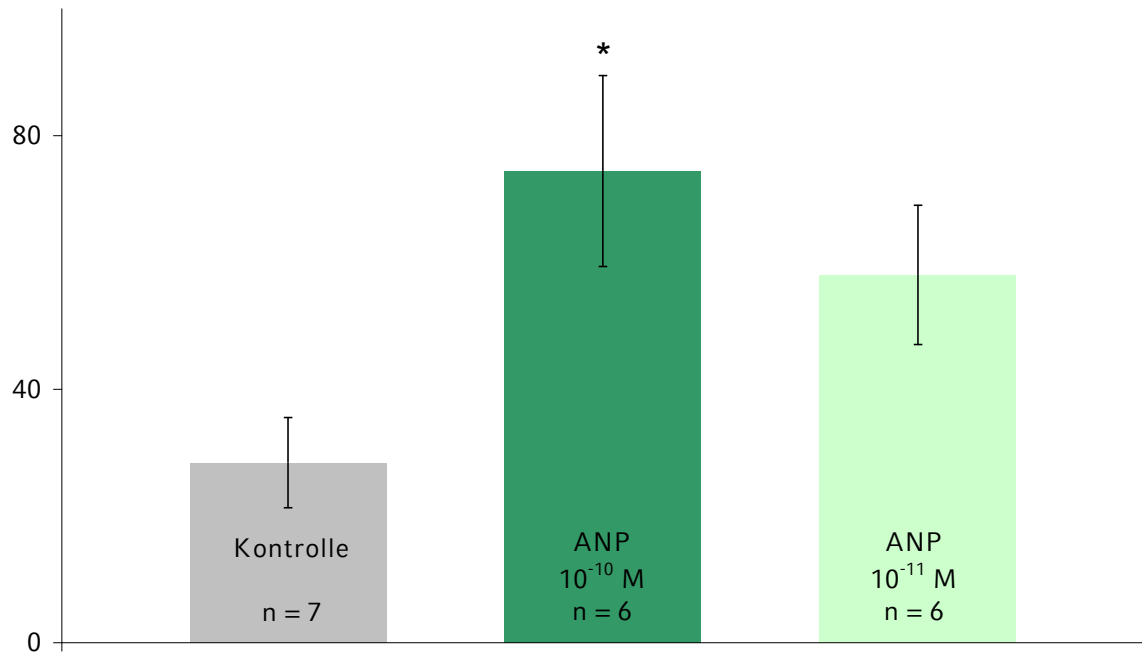


Abbildung 13: Gesamtfreisetzung von Heparansulfat über 20 Minuten

In der Abbildung ist grafisch die Gesamtfreisetzung von Heparansulfat über 20 Minuten aufgezeigt (Summe der Messpunkte in Abbildung 12). Werte in $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$; \pm SEM. * = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

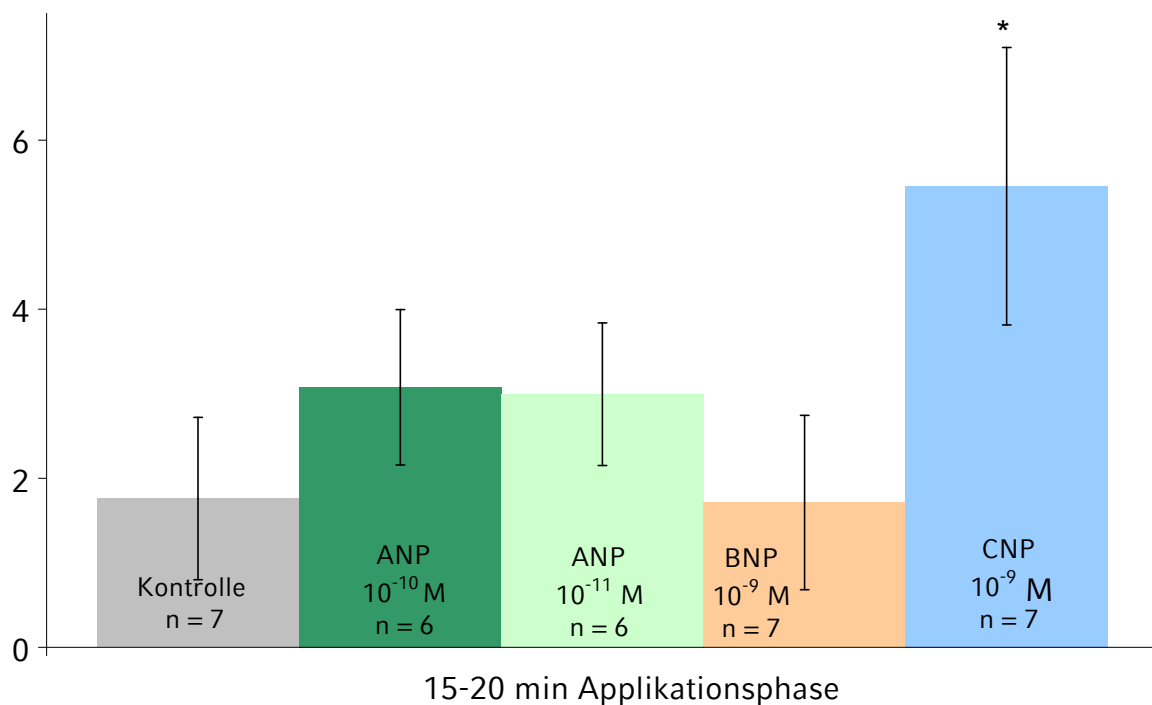


Abbildung 14: Freisetzung von Heparansulfat im Vergleich der Versuchgruppen

In der Abbildung ist grafisch die Freisetzung von Heparansulfat in der Kontrollgruppe und nach 20-minütiger Infusion von natriuretischen Peptiden für den Zeitraum von 15–20 Minuten aufgezeigt. Werte in $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$; \pm SEM; * = $p < 0,05$ gegen Kontrolle

3.7.2 Syndekan-1

Die Freisetzung von Syndekan-1 zeigte für alle Gruppen nach 20-minütiger Perfusion mit natriuretischen Peptiden im Vergleich zum 20-Minuten-Wert der Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung (Abbildung 15). Am deutlichsten war der Anstieg bei ANP in 10^{-10} M Konzentration bis auf das Dreifache des Kontrollwerts, der bei 45,5 ng/min/g lag.

Allerdings kam es unter der Gabe von ANP in hoher Konzentration (10^{-10} M) deutlich später zu einem signifikanten Anstieg als unter Gabe von ANP in niedriger Konzentration (10^{-11} M), wo bereits nach fünf Minuten ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand (Abbildung 15). Bei beiden Konzentrationen von ANP wurde in der Gesamtmenge über 20 Minuten deutlich mehr Syndekan freigesetzt als in der Kontrollgruppe (Abbildung 16). Die beiden ANP-Gruppen unterschieden sich dabei nicht.

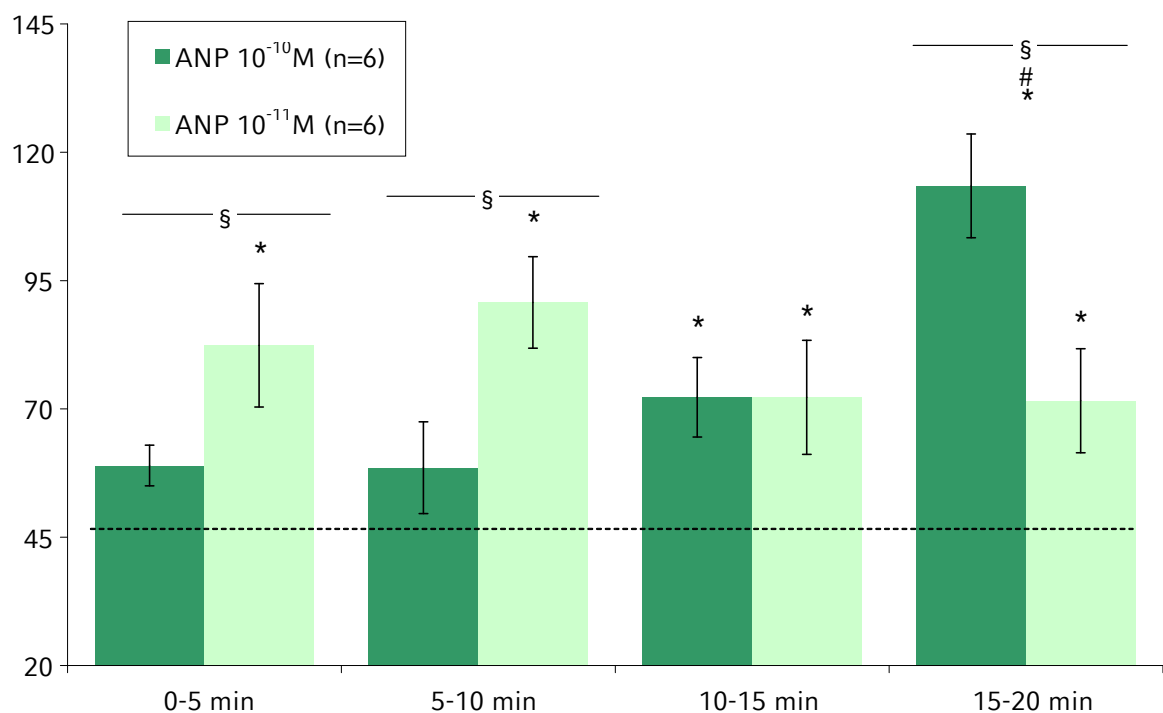


Abbildung 15: Freisetzung von Syndekan im Zeitverlauf

In der Abbildung ist grafisch die Freisetzung von Syndekan in der Kontrollgruppe und während 20-minütiger Infusion von ANP 10^{-10} M oder 10^{-11} M aufgezeigt. Die Kontrollfreisetzung beträgt 45,5 ng/min/g und wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. Werte in ng/min/g \pm SEM; * = p < 0,05 gegen Kontrollwert; # = p < 0,05 gegen alle anderen Werte; § = p < 0,05 zwischen den Versuchsgruppen

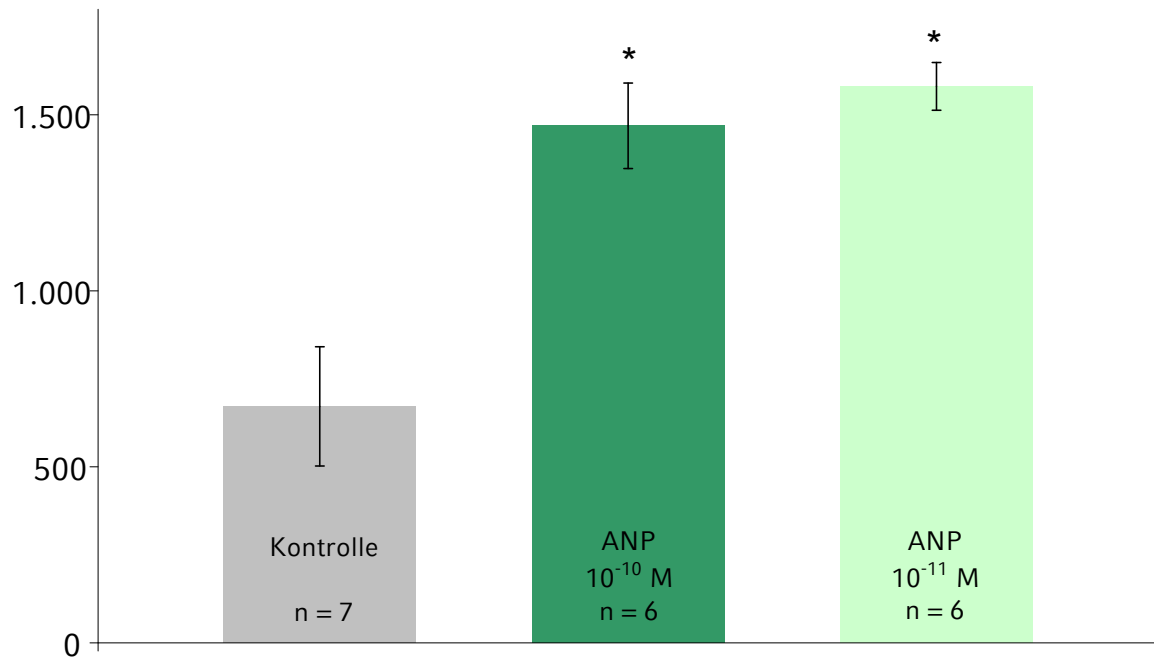


Abbildung 16: Gesamtfreisetzung von Syndekan über 20 Minuten

In der Abbildung ist grafisch die Gesamtfreisetzung von Syndekan über 20 Minuten aufgezeigt. Werte in ng/g ± SEM; * = p<0,05 gegen Kontrolle.

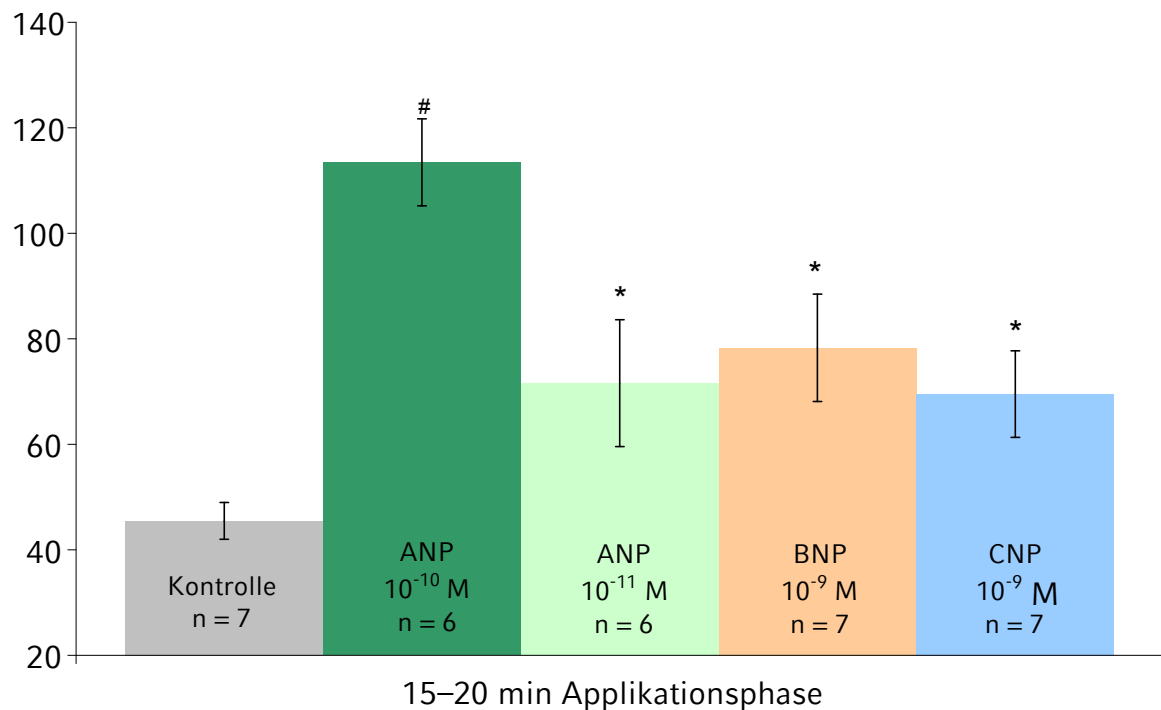


Abbildung 17: Freisetzung von Syndekan im Vergleich der Versuchsgruppen

In der Abbildung ist grafisch die Freisetzung von Syndekan in der Kontrollgruppe und nach 15–20-minütiger Infusion von natriuretischem Peptid für den Zeitraum von 15–20 Minuten aufgezeigt. Werte in ng/min/g ± SEM; * = p<0,05 gegen Kontrollwert; # = p < 0,05 gegen alle anderen Versuchsgruppen.

3.7.3 Shedding unter Protease-Inhibition

3.7.3.1 Heparansulfat

In allen Proteaseinhibitor-Versuchsgruppen zeigte sich – bereits unter Infusion der Proteaseinhibitoren – paradoxerweise eine hohe basale Freisetzung von Heparansulfat. Der Mittelwert der basalen Heparansulfat-Freisetzung unter Inhibitor-Infusion lag ca. siebenfach über dem Wert der sonstigen Versuchsgruppen (Kontrolle und natriuretische Peptide ohne Inhibitor).

Die ANP induzierte Freisetzung von Heparansulfat verringerte sich jedoch signifikant unter OP und PI gegenüber den Werten bei alleiniger Gabe von ANP. Der Wert für die Heparansulfat-Freisetzung nach 20 Minuten lag in beiden Gruppen signifikant unter dem Wert der Heparansulfatfreisetzung bei alleiniger Gabe von ANP ($2,64, \pm 0,79 \mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ vs. $3,07 \mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$), bei PI sogar unter dem Kontrollwert ($0,74, \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ vs. $1,51 \mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$).

Unter dem Einfluss von AT III dagegen wurde die ANP-bedingte Freisetzung von Heparansulfat nicht vermindert.

3.7.3.2 Syndekan-1

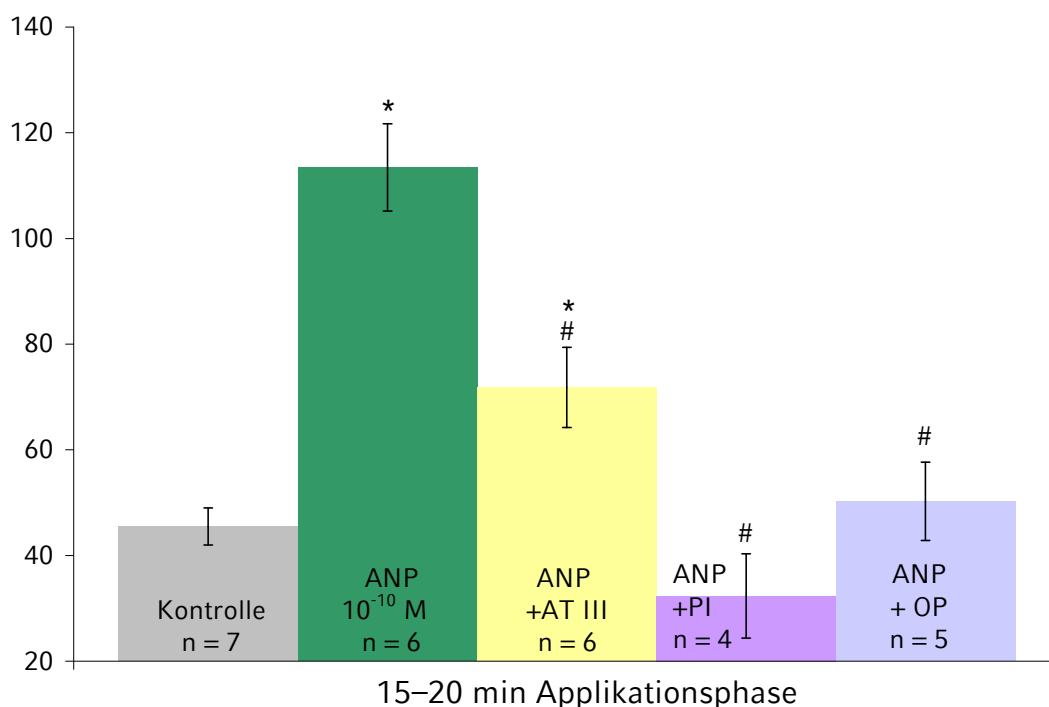


Abbildung 18: Freisetzung von Syndekan unter ANP und Proteaseinhibitoren

In der Abbildung ist grafisch die Freisetzung von Syndekan nach 20-minütiger Infusion von natriuretischem Peptid ohne und mit Inhibitorsubstanzen aufgezeigt. Werte in $\text{ng}/\text{min}/\text{g} \pm \text{SEM}$; * = $p < 0,05$ gegen Kontrolle; # = $p < 0,05$ gegen ANP 10^{-10} M.

AT III vermochte den Effekt von ANP auf das Shedding von Syndekan zu halbieren; es bestand aber weiter ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (Abbildung 18). Unter OP und PI konnte eine signifikante Verminderung der Syndekan-Freisetzung auf (OP) bzw. sogar unter (PI) den Kontrollwert ohne ANP erzielt werden.

3.8. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 19) dokumentieren den Zustand der endothelialen Glykokalyx nach 20 Minuten Infusion natriuretischer Peptide. In allen Aufnahmen war im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Beschädigung der endothelialen Glykokalyx zu erkennen, desweiteren ein mehr oder minder ausgeprägtes Gewebsödem.

Reste der Glykokalyx fanden sich nach der Behandlung mit ANP und BNP, während in der CNP-Gruppe nahezu keine Glykokalyx mehr sichtbar war.

Interessanterweise war bei den Herzen unter dem Einfluss von Antithrombin und ANP ebenso wenig Glykokalyx sichtbar wie in der Gruppe, die nur mit ANP behandelt wurde.

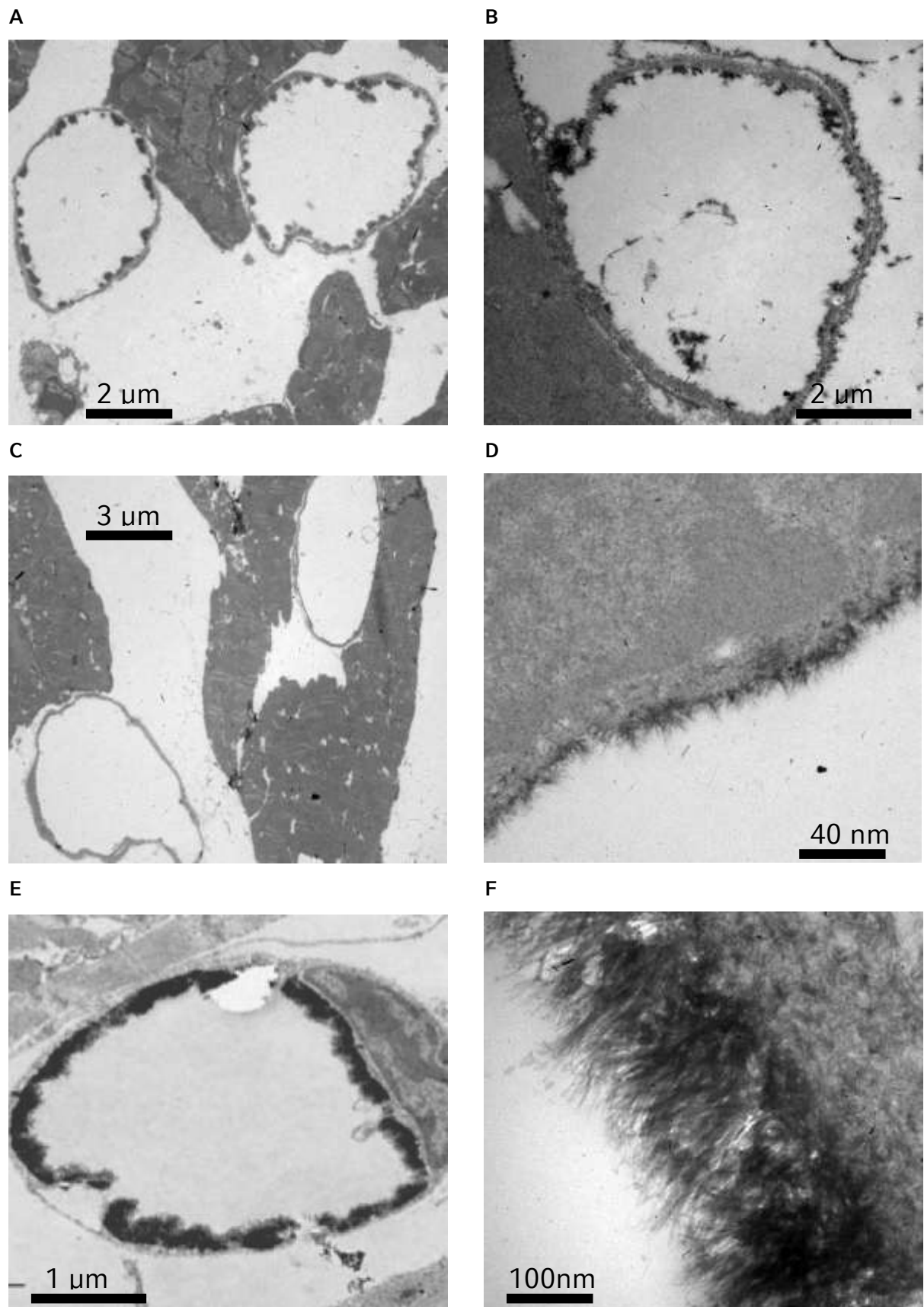


Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Abbildungen zeigen beispielhafte elektronenmikroskopische Aufnahmen von einzelnen angefertigten Schnitten. A = ANP, B = BNP, C = CNP, D = ANP+AT III, E,F Kontrollbilder

4. Diskussion

Über die Funktion und Bedeutung der Rezeptoren für natriuretische Peptide als auch für den Prozess der Ablösung der endothelialen Glykokalyx (Shedding) an sich gibt es zufriedenstellende Ergebnisse. Bisher wurde jedoch nicht untersucht, ob und in welcher Beziehung diese beiden Prozesse zueinander stehen. In der vorliegenden Arbeit sollte über den Vergleich der drei natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP sowie eine Hemmung von möglichen Zielproteasen diese fehlende Verbindung der natriuretischen Peptidrezeptoren mit dem endothelialen Glykokalyxshedding näher untersucht werden.

Dazu wurden im Modell des isoliert perfundierten Säugetierherzens insbesondere die konzentrationsabhängige Wirkungen von ANP als ein Vertreter der natriuretischen Peptide auf die endotheliale Glykokalyx und der Effekt von Proteaseinhibitoren auf diesen Prozess untersucht.

Natriuretische Peptide vermitteln ihre Wirkung über die membranständigen Rezeptoren NPR-A und NPR-B mit jeweils unterschiedlicher Bindungsaffinität der natriuretischen Peptide (siehe Tabelle 1, Seite 9). In Folge der Bindung wird eine membranständige Guanylylzyklase A aktiviert, die zur Erhöhung der intrazellulären Spiegel von cGMP führt. Curry et al. konnten jüngst in einem Guanylylzyklase-Knockout-Modell zeigen, dass es durch ANP-Gabe zu einer Veränderung der Gefäßpermeabilität kommt, die beim Fehlen der Guanylylzyklase schwächer ausfällt (Curry et al., 2010).

4.1. Die Wirkung natriuretischer Peptide auf die Glykokalyx

ANP vermochte im physiologischen Konzentrationsbereich von 10^{-11}M bis 10^{-10}M die koronarvenöse Abgabe von Syndekan und Heparansulfat zu steigern. Ganz eindeutig ist die Wirkung von ANP auf das Shedding endothelialer Glykokalyx konzentrationsabhängig, die Freisetzung nach 5- und 20-minütiger Gabe unterschied sich in beiden Versuchsgruppen signifikant. Es scheint aber keine „klassisch“ lineare Abhängigkeit auf das Shedding zu geben. Im Gegenteil konnte ANP in hoher Konzentration erst nach 20 Minuten einen Effekt erzielen, der die Wirkung von ANP in niedriger Konzentration übertraf. Auch unterschieden sich die beiden Gruppen in der Gesamtfreisetzung nicht.

Möglicherweise spielt bei dieser Kinetik auch eine Wirkung am C-Rezeptor für natriuretische Peptide (NPR-C) eine Rolle, der bislang wenig untersucht ist. Die

Wirkung am NPR-C soll die über NPR-A und NPR-B vermittelten Funktionen verstärken und die cGMP-Bildung weiter fördern (Koller & Goeddel, 1992).

Auch BNP und CNP vermochten die Abspaltung der Glykokalyx vom Koronarendothel zu induzieren. Für BNP wurde die applizierte Konzentration so gewählt, dass sie der biochemischen Reaktion von ANP in niedriger Konzentration am natriuretischen Peptid-Rezeptor A (NPR-A) gleicht. Bekanntlich verfügt BNP nur über eine etwa zehnfach geringere Affinität zu NPR-A als ANP (siehe Tabelle 1). Entsprechend führte die Gabe von BNP in einer für ANP 10^{-10} M äquivalenten Konzentration von 10^{-9} M zu einer vergleichbaren Wirkung auf die Freisetzung von Heparansulfat und Syndekan.

Das zeigt erneut, dass es sich bei den Befunden nicht um unspezifische Effekte natriuretischer Peptide an der endothelialen Glykokalyx handelt, sondern dass eine von der Rezeptoraktivierung abhängige Reaktion auf die Gabe natriuretischer Peptide erfolgt, die zum Shedding führt. Insgesamt deuten die Befunde auf eine dominante Rolle des NPR-B.

4.2. Proteaseinhibitoren

Bei der Wirkung von Proteaseinhibitoren auf ANP-induziertes Shedding der endothelialen Glykokalyx zeigte sich für Orthophenanthrolin (OP), einem unspezifischen Inhibitor von Matrix-Metalloproteasen, die beste Hemmwirkung. Alleine OP war in der Lage, Shedding von Syndekan unter ANP auf einen Wert zu vermindern, der dem Wert basalen Sheddings von Syndekan entspricht. Offenbar wird ANP-induziertes Shedding über denselben Mechanismus vermittelt, über den auch in früheren Arbeiten (Mulivor & Lipowsky, 2009) Syndekan-Shedding nachgewiesen werden konnte. Die Hemmung dieses Prozesses gelingt durch Chelatbildner von Metallionen. Selbstverständlich werden dabei auch weitere metallabhängige Prozesse der Zelle, insbesondere der Mitochondrien, gehemmt (Gerber et al., 1996). Die Beobachtung, dass die Transsudatbildung und die Laktatkonzentration unter Gabe von OP anstiegen, lässt sich durch diese Tatsache erklären. Damit ist Orthophenanthrolin ungeeignet für eine klinische Anwendung. Die Wirkung von Antithrombin (AT III) auf die ANP-induzierte Abspaltung von Bestandteilen der endothelialen Glykokalyx war uneinheitlich. Unter dem Einfluss von AT III wurde die Freisetzung von Heparansulfat nicht verhindert, im Gegenteil wurde die Freisetzung verzehnfacht. Dies überrascht, denn in entsprechenden

Vorarbeiten (Chappell *et al.*, 2009b) konnte nach Ischämie/Reperfusion durch 35-minütige AT III-Vorbehandlung nach 20 Minuten Reperfusion eine Reduktion der Heparansulfat-Freisetzung auf den Basalwert erreicht werden. Fünf Minuten nach Reperfusion war die Heparansulfat-Freisetzung jedoch ebenso deutlich erhöht wie hier. Möglicherweise wird diese Wirkung von AT III über die Beeinflussung der Prostaglandin-Synthese der Endothelzellen gesteuert (Mizutani *et al.*, 2003). Eventuell wäre zum Nachweis einer schützenden Wirkung eine längere Exposition gegenüber AT III erforderlich gewesen.

AT III ist ein Serinproteaseinhibitor, dessen Hauptaufgabe in der physiologischen Hemmung von Thrombin gesehen wird. Thrombin führt über seinen Rezeptor zur Erhöhung von cGMP-Spiegeln, dem gleichen Mechanismus wie für ANP (Baron *et al.*, 1989; Takata *et al.*, 1996). Somit könnte eine Verminderung des basalen cGMP-Spiegels durch Anwendung von Antithrombin die Wirkung von ANP auf die Endothelzelle und die Auswirkungen auf die endotheliale Glykokalyx abschwächen. Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass AT III selbst an Heparansulfat bindet. Ein Shedding von Heparansulfat führt zu hohen Konzentrationen an löslichem Heparansulfat und könnte auf diesem Weg die Wirkung von AT III an der Membran beeinflussen (Kainulainen *et al.*, 1998), denn lösliche Liganden können mit membranständigen Bindungspartnern konkurrieren. Interessanterweise besitzt auch der Rezeptor für ANP eine lösliche Isoform (Kuhn, 2004). Kainulainen *et al.* zeigten, dass eine Interaktion der Syndekan-1 Ektodomäne mit verschiedenen Proteasen den Effekt der Antiprotease reduziert. Auch diese Möglichkeiten sollten in der Beurteilung der Interaktionen der Inhibitoren an der Glykokalyx berücksichtigt werden.

Die Inhibitorsubstanzen selbst führten zu einer gewissen Freisetzung von Heparansulfat, dessen Messwerte initial signifikant über den Werten der Kontrollgruppe ohne Inhibitorgabe lagen. Die Messwerte für die Freisetzung von Heparansulfat nach 20 Minuten Infusion natriuretischer Peptide unter der Inhibitorinfusion lagen jedoch allesamt unter den gemessenen Werten für die Heparansulfat-Freisetzung, sowohl für die Kontrollgruppe, als auch für die Basalwerte vor ANP-Gabe.

Eine Erklärung der Abnahme durch „Verbrauch“ von Heparansulfat auf Grund eines von den Inhibitorsubstanzen selbst verursachten Heparansulfatshedding kommt nicht in Betracht. In früheren Untersuchungen in denen das Enzym Heparinase

infundiert wurde, kam es zu anhaltender Freisetzung von Heparansulfat, die um Größenordnungen höher lag als die hier beobachteten Raten (Chappell *et al.*, 2008b).

Erstaunlicherweise vermochte AT III den Effekt von ANP bei Shedding von Syndekan zu halbieren. Somit unterschieden sich die Wirkungen auf diese zwei Komponenten der Glykokalyx.

Dieser Befund zeigt ein weiteres Mal, dass zwischen dem Shedding von Heparansulfat und Syndekan zu unterscheiden ist. Nicht ein Shedding-Trigger führt zum Shedding beider Glykokalyxbestandteile in gleicher Weise, sondern verschiedene Trigger dürften sich verschieden stark auf das Shedding von Heparansulfat, Syndekan und weiteren Glykokalyx-Bestandteilen auswirken.

Dementsprechend zeigen EM-Bilder (Abbildung 19 D) nach Gabe von AT III und ANP zwar eine deutlich verringerte Dicke und Ausdehnung der Glykokalyx, die direkt an der Zellmembran verankerten Syndekane scheinen aber noch größtenteils vorhanden. Fehlt das an diesen Molekülen befestigte Heparansulfat, kollabiert das Gerüst. Damit lässt sich postulieren, dass AT III das Shedding von Syndekan verhindern kann um den Preis eines erhöhten Heparansulfat-Sheddings. Verständlich wird diese „Wirkungsdissoziation“, wenn man bedenkt, dass die Abspaltung von Heparansulfat durch Heparanasen erfolgt und nicht direkt durch Proteasen möglich ist.

4.3. Hydroxyethylstärke

Die Netto-Passage des Kolloids Hydroxyethylstärke (HES) über die Gefäßschranke wurde anhand der mit dem Transsudat abgegebenen Menge bestimmt. Dies entspricht direkt dem Produkt (PS-Produkt) aus Permeabilität und filtrierender Gefäßoberfläche (*engl.* surface). In keinem anderen intakten Gefäßsystem kann das PS-Produkt so unmittelbar bestimmt werden wie am isoliert perfundierten Herzen.

Die Gabe von ANP steigerte die Nettoabgabe von HES aus dem Koronarsystem in einer Zeit-abhängigen Art (Abbildung 11 und Bruegger *et al.*, 2005).

Diese Steigerung des PS-Produkts muss auf eine Zunahme der Kolloid-Permeabilität zurück geführt werden, da ANP zu keinerlei Veränderung des Flusses oder des Perfusionsdrucks im Koronarsystem führte. Die Erleichterung des Durchtritts entspricht dem Verlust endothelialer Glykokalyx (Chappell *et al.*, 2009b; Becker *et al.*, 2010b).

Überraschend war, dass die im Transsudat gemessene Konzentration von HES in den Versuchsgruppen ANP, CNP und ANP unter AT III den Wert der Effluatkonzentration um Werte bis zu 20 Prozent überstieg – und damit die HES-Konzentration im interstitiellen Kompartiment höher geworden war als im intravaskulären Raum. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass der Wiedereintritt von HES in den vaskulären Raum, der vermutlich im venulären Segment statt finden sollte (Jacob *et al.*, 2007a; Chappell *et al.*, 2009b; Becker *et al.*, 2010a), relativ zum arteriolen und kapillären Austritt erschwert ist nach der Einwirkung von ANP. Ob diese „Ventilverbindung“ den Elementen der Basalmembran ursächlich zukommt, ist noch zu klären.

Im klinischen Alltag werden in Europa zur Volumensubstitution häufig HES-Zubereitungen verwendet, da der Volumeneffekt hoch und die Deposition in das Gewebe gering sein sollen (Marx, Shock 2004; Meyer P, Acta Anaest Scand 2008).

In der klinischen Problematik der Sepsis hat sich jedoch gezeigt, dass dem nicht immer so ist: Bei hypovolämen Patienten sollen auch enorme Mengen (bis zu mehreren Litern am Tag) an intravasal zugeführtem Volumen nicht in der Lage sein, eine Kreislaufstabilisierung zu erreichen. Dieser Zustand geht einher mit einer massiven Gewebsödembildung. Offensichtlich kann es also unter bestimmten Situationen zu einer Endothelstörung und zur Ablagerung von HES im Gewebe kommen. Experimentelle Daten belegen diese Beobachtungen (Marx, 2003; Persson & Grande, 2006; van der Heijden *et al.*, 2009). HES muss also unter bestimmten Bedingungen über die Gefäßbarriere filtrierte werden, kann aber dann aus unbekannten Grund nicht wieder zurück ins Gefäßlumen kommen. Somit decken sich unsere experimentiellen Befunde einer gegenüber der Effluatkonzentration erhöhten Transsudatkonzentration von HES mit den klinischen Beobachtungen.

4.4. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentieren den Zustand der endothelialen Glykokalyx *in situ*. In allen erstellten Aufnahmen wurde eine Beschädigung der endothelialen Glykokalyx dokumentiert, ebenso wie ein mehr oder minder ausgeprägtes Gewebsödem. Alleine die – wenn auch kurze – Ischämiephase während der Präparation und die aufwändige Behandlung des Präparats können kleinere Defekte in der Glykokalyx erklären.

Eine aufgelockerte, deutlich beschädigte, teilweise nur mehr in Resten vorhandene Glykokalyx fand sich nach der Behandlung mit ANP und BNP, wobei unter der Einwirkung von CNP am meisten Glykokalyx zerstört wurde. Hier war letztlich nahezu keine Glykokalyx mehr feststellbar.

Interessanterweise war bei den Herzen unter dem Einfluss von Antithrombin und ANP auf den ersten Blick ähnlich wenig luminale Glykokalyx vorhanden wie in der Gruppe, die nur mit ANP behandelt wurde. Ein Kollaps des Glykokalyxgerüsts nach Verlust von hauptsächlich Heparansulfat könnte dieses Phänomen erklären. Die negativ geladenen Heparansulfat-Seitenketten stoßen sich gegenseitig ab und verleihen der Glykokalyx somit eine dreidimensionale Stabilität. In der AT III-Gruppe war das Gewebsödem niedriger ausgeprägt. Das Gewebsödem ist jedoch nicht immer eindeutig von Schnittartefakten abzugrenzen. Offensichtlich konnte also Antithrombin in physiologischer Konzentration den schädigenden Effekt von ANP auf die luminale endotheliale Glykokalyx nicht verhindern, die ANP bedingte Steigerung der hydraulischen Leitfähigkeit aber schon.

Einschränkend ist anzumerken, dass es sich bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen jeweils um eine zufällige Stichprobe handelt, die nur qualitative Rückschlüsse auf das tatsächliche Geschehen zulässt. Auch die Methodik ist fehleranfällig, denn selbst in sehr gut perfundierten und fixierten gesunden Herzen finden sich immer wieder Gefäße, in denen keine Glykokalyx nachweisbar ist. In der Zusammenschau kann die Methode lediglich evidente Befunde weiter unterstützen und anschaulich machen.

4.5. Methodenkritik

Die Koronarperfusion isolierter Herzen nach Langendorff ist als Methode zur Untersuchung des Koronargefäßsystems und speziell der endothelialen Glykokalyx geradezu ideal. Im Gegensatz zu *in vivo*-Modellen entfallen eine große Zahl an Interaktionen (Blutbestandteile, enzymatische und inflammatorische Prozesse, Redox-Reaktionen, vegetative Einflüsse) die auf das Endothel Einfluß nehmen und unter Umständen einen Versuchsablauf komplexer machen können. Dennoch handelt es sich bei dem Modell um ein – wenn auch mit einer artifiziellen Lösung perfundiertes – schlagendes, lebendiges Organ. Damit nimmt die Methode eine Mittelstellung zwischen *in vitro* und *in vivo*-Methoden ein, unter Ausschluss vieler Nachteile der jeweiligen Methoden. Aussagen über die Glykokalyx, die auf Basis

dieser Untersuchungen am Herzen getroffen werden, lassen sich ersten Erkenntnissen zu Folge auf den Gesamtorganismus übertragen (Rehm *et al.*, 2004; Bruegger *et al.*, 2009; Curry *et al.*, 2010).

Die nötige Herzpräparation stellt allerdings eine Einschränkung dar. Die hohe Zahl abgebrochener Versuchen aufgrund der in der kurzen ischämischen Phase gesetzten Schäden zeigt, wie labil das Langendorff-System ist.

Die hohen Basalwerte für die koronarvenöse Abgabe von Purinen und Harnsäure verbunden mit einer Tendenz, sich im Versuchsverlauf zu verringern, weisen darauf hin, dass es zu einer signifikanten ischämischen Phase während der Präparation gekommen war.

Der beobachtete Anstieg der Transsudatbildung in der Kontrollgruppe weist als Surrogatparameter auf einen schleichenden Funktionsverlust der koronaren Gefäßbarriere unter der Perfusion hin. Die Netto-Filtration im Koronarsystem (Transsudat-Fluß) lag bei Kontroll-Herzen im Bereich in anderen Studien ermittelter Werte bei Langendorff-Präparationen (Kupatt *et al.*, 1996; Sutherland & Hearse, 2000). Beeinflusst wird die basale Transsudatbildung freilich von der Güte der Präparation, vor allem beim Setzen von Gefäßligaturen. Solche „Makrolecks“ wurden nach Möglichkeit ausgeschlossen. Als deutliche Limitation ist hier aber zu sehen, dass die Perfusion unphysiologischerweise kolloidfrei durchgeführt wurde, um eine Interaktion von vornherein auszuschließen. Daher können die Transsudatwerte nicht auf *in vitro*-Verhältnisse direkt übertragen werden.

Ortho-Phenanthrolin ist ein unspezifischer Hemmer von Metalloenzymen. Obwohl darunter die besten Ergebnisse in der Hemmung des Glykokalyxsheddings zu verzeichnen waren, muss dieser Umstand hinsichtlich der Hemmung auch anderer wichtiger Enzyme bedacht werden, wenn ein Einsatz am Tiermodell geplant ist (Gerber *et al.*, 1996). Für eine klinische Anwendung ist OP aufgrund der geringen Spezifität für Metalloproteasen nicht geeignet.

4.6. Ausblick

Für Shedding scheint nicht unbedingt eine bestimmte Sheddase verantwortlich zu sein. Vielmehr arbeiten mehrere Sheddasen gewebespezifisch zusammen, vielleicht sogar krankheitsspezifisch (Park *et al.*, 2004).

Unter der Annahme, dass es durch Shedding der endothelialen Glykokalyx zu erhöhter Morbidität und Mortalität kommt, gilt es eine Zielprotease zu finden, deren Hemmung Shedding der endothelialen Glykokalyx möglichst vollständig blockieren kann, ohne weitere Funktionen des Endothels zu beeinflussen. Mit der Erkenntnis und dem Verständnis der Bedeutung der Glykokalyx wird die Suche nach einer solchen (Matrixmetallo-)Protease in der Zukunft weitergehen.

Die Rolle des ANP scheint widersprüchlich zu sein: Während in dieser und weiteren zitierten Arbeiten ANP eine deutlich myokard- und endothelschädigende Wirkung zu haben scheint (Vellaichamy *et al.*, 2005), wurde vor allem in *in vitro*-Studien mehrfach ein protektiver, membranstabilisierender Effekt gezeigt (Furst *et al.*, 2008). In pharmakologischer Dosis wurde in der Lunge eine Schutzfunktion vor Lungenödem nachgewiesen (Zimmerman *et al.*, 1990).

Möglicherweise ist der Mediator cGMP für diese widersprüchlichen Wirkungen auf Endothelzellen verantwortlich, wie schon in früheren Arbeiten vermutet (Newman *et al.*, 1992). Die Wirkung von cGMP auf die endotheliale Permeabilität ist vor allem abhängig von den Konzentrationen der Phosphodiesterase PDE2A und PDE3A (Surapisitchat *et al.*, 2007). Die Daten deuten darauf hin, dass cGMP bei niedrigeren Konzentrationen PDE3A hemmt, bei höheren Konzentrationen aber PDE2A aktiviert, was eine gegenteilige Wirkung verursacht, siehe Abbildung 20.

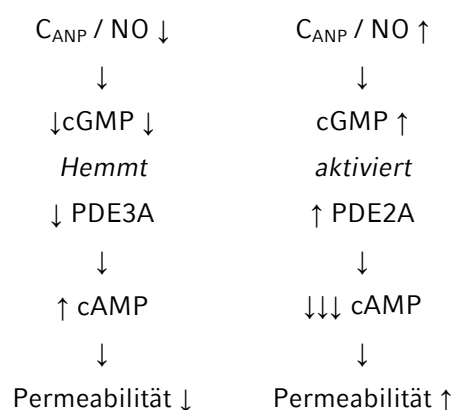


Abbildung 20: Unterschiedliche Effekte von ANP auf die endotheliale Permeabilität
Surapisitchat *et al.* (2007). NO = Stickoxid

So scheint es auch gerade folgerichtig, dass eine Therapie mit ANP nach Myokardinfarkt keine Prognoseverbesserung bringen konnte (Miura & Miki, 2008). Die unterschiedlichen Wirkungen von ANP und der Inhibitoren auf die koronare Gefäßschranke könnten daher auf die differenzierte Wirkungsweise bezüglich des cGMP / cAMP-Systems zurückgeführt werden. So lässt es sich erklären, dass ANP in Zusammenhang mit den untersuchten Inhibitoren so unterschiedliche Wirkungen auf die Barrieriefunktion haben kann. Ein Extrembeispiel dafür ist die deutlich gesteigerte Freisetzung von Heparansulfat bei gleichzeitiger Hemmung der Syndekan-Freisetzung unter AT III oder als Gegenbeispiel eine erhöhte Transsudatbildung unter OP bei exzellenter Hemmung der Syndekan-Freisetzung und damit des Sheddings endothelialer Glykokalyx.

Natriuretische Peptide spielen im Orchester der vasoaktiven Substanzen eine Hauptrolle bei Morbidität und Mortalität unter Volumentherapie, bei Sepsis sowie Ischämie/Reperfusion. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass hierbei die endotheliale Glykokalyx im Mittelpunkt steht. Viele weitere Studien werden notwendig sein, um dieses „Great Barrier Reef“ (Chappell *et al.*, 2008a) umfassend zu entdecken und seine ebenso komplexen wie auch faszinierenden Strukturen zu bewahren (Becker *et al.*, 2010a,b).

5. Zusammenfassung

Die endotheliale Glykokalyx ist eine am Gefäßendothel verankerte Schicht aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen. Bekannt seit nahezu 70 Jahren, rückte die endotheliale Glykokalyx erst in den vergangenen Jahren zunehmend ins Interesse der Forschung. Sie hat eine bislang ungeklärte Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen. Neben der vaskulären Barrierefunktion und als Vermittler Schubspannungs-induzierter Vasodilatation sind für Ihre Funktion die Interaktionen mit plasmatischen und zellulären Blutbestandteilen von höchster Bedeutung. Einer der Faktoren, die die Glykokalyx beeinflussen, ist das in den Vorhöfen des Herzens bei Volumenbelastung freigesetzte atriale natriuretische Peptid (ANP). Es führt als endokrine Antwort auf Hypervolämie zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität über die Zerstörung der Glykokalyx („Shedding“). Daneben können Ischämie und Reperfusion, Entzündungsreaktionen, Sepsis und Atherosklerose die Glykokalyx schädigen.

Die vorliegende Arbeit sollte klären, welche Effekte die verschiedenen Vertreter der Familie der natriuretischen Peptide auf die endotheliale Glykokalyx haben, und ob der Effekt von ANP durch Hemmung von Proteasen hemmbar ist.

Im Modell des isoliert perfundierten Säugetierherzens wurden der Einfluss von ANP, BNP und CNP und von ANP jeweils in Anwesenheit von einem Gemisch an Proteaseinhibitoren, von ortho-Phenanthrolin (OP) sowie Antithrombin III (AT III) auf die endotheliale Glykokalyx untersucht. Die Glykokalyx-Bestandteile Syndekan und Heparansulfat wurden mittels spezifischer ELISA bestimmt. Bei einigen Versuchen wurde das Herz nach der Fixierung elektronenmikroskopisch untersucht. ANP vermochte im physiologischen Konzentrationsbereich von 10^{-11} – 10^{-10} M die koronarvenöse Abgabe von Syndekan und Heparansulfat abhängig von der Konzentration zu steigern. Sowohl BNP als auch CNP vermochten in höheren Konzentrationen (10^{-9} M) ähnlich zu wirken wie ANP. Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit lässt eine Wirkung über den allen drei Peptiden gemeinsamen natriuretischen Peptid Rezeptor vom Typ B vermuten. Am Besten konnte der unspezifische Chelator 1,10-ortho-Phenanthrolin durch Hemmung von Metallionen-abhängigen Proteasen Shedding verhindern. Die Wirkung des Serinproteasen-Inhibitors AT III auf die ANP-induzierte Abspaltung von Bestandteilen der endothelialen Glykokalyx war uneinheitlich: Die Freisetzung von

Heparansulfat wurde nicht verhindert, jedoch der Effekt auf das Syndekan-Shedding halbiert. Alle drei natriuretischen Peptide verursachten eine Zunahme der Netto-Filtration von Perfusat im Koronarsystem. Dieses konnte direkt in Form des sogenannten Transsudat-Flusses bestimmt werden. Gleichsam wie die hydraulische Leitfähigkeit erhöhte sich die Extravasation von Hydroxyethylstärke (Molekulargewicht 130.000), d.h. auch die Permeabilität für Kolloide nahm zu. Überraschend war, dass die im Transsudat gemessene Konzentration von HES in den Versuchsgruppen ANP, CNP und ANP + AT III den Wert der Effluatkonzentration um Werte bis zu 20 Prozent überstieg – und damit die HES-Konzentration im interstitiellen Kompartiment höher wurde als im intravaskulären Raum. Dies lässt auf eine „Ventilfunktion“ am venulären Kapillarende schließen, die eine Rückkehr von Kolloid aus dem Interstitium in das Gefäßlumen erschwert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Glykokalyx stützen die gewonnenen Ergebnisse.

Für das Shedding durch natriuretische Peptide scheint nicht eine einzelne spezifische Protease verantwortlich zu sein. Vielmehr arbeiten wohl mehrere Proteasen, aktiviert über die bekannten Rezeptoren für natriuretische Peptide zusammen.

Für die Hemmung der Zerstörung der Glykokalyx scheint die Erforschung einer Hemmung von Metalloproteaseaktivität ein vielversprechender Ansatz zu sein.

6. Literaturverzeichnis

- Abildgaard U. (2007). Antithrombin--early prophecies and present challenges. *Thromb Haemost* **98**, 97-104.
- Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S & Curry FE. (2004). Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol* **557**, 889-907.
- Anand-Srivastava MB & Trachte GJ. (1993). Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* **45**, 455-497.
- Baliga RS, Zhao L, Madhani M, Lopez-Torondel B, Visintin C, Selwood D, Wilkins MR, MacAllister RJ & Hobbs AJ. (2008). Synergy between natriuretic peptides and phosphodiesterase 5 inhibitors ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 861-869.
- Barker AL, Konopatskaya O, Neal CR, Macpherson JV, Whatmore JL, Winlove CP, Unwin PR & Shore AC. (2004). Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 1006-1011.
- Baron DA, Lofton CE, Newman WH & Currie MG. (1989). Atriopeptin inhibition of thrombin-mediated changes in the morphology and permeability of endothelial monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3394-3398.
- Becker BF. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* **14**, 615-631.
- Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T & Jacob M. (2010a). Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res* **87**, 300-310.
- Becker BF, Chappell D & Jacob M. (2010b). Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol*.
- Bode L, Salvestrini C, Park PW, Li JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Murch S & Freeze HH. (2008). Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *J Clin Invest* **118**, 229-238.

- Brandstrup B, Tonnesen H, Beier-Holgersen R, Hjortso E, Ording H, Lindorff-Larsen K, Rasmussen MS, Lannig C, Wallin L, Iversen LH, Gramkow CS, Okholm M, Blemmer T, Svendsen PE, Rottensten HH, Thage B, Riis J, Jeppesen IS, Teilum D, Christensen AM, Graungaard B & Pott F. (2003). Effects of intravenous fluid restriction on postoperative complications: comparison of two perioperative fluid regimens: a randomized assessor-blinded multicenter trial. *Ann Surg* **238**, 641-648.
- Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P & Becker BF. (2005). Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1993-1999.
- Bruegger D, Rehm M, Abicht J, Paul JO, Stoeckelhuber M, Pfirrmann M, Reichart B, Becker BF & Christ F. (2009). Shedding of the endothelial glycocalyx during cardiac surgery: on-pump versus off-pump coronary artery bypass graft surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **138**, 1445-1447.
- Brule S, Charnaux N, Sutton A, Ledoux D, Chaigneau T, Saffar L & Gattegno L. (2006). The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology* **16**, 488-501.
- Bunger R, Haddy FJ, Querengasser A & Gerlach E. (1975). An isolated guinea pig heart preparation with in vivo like features. *Pflugers Arch* **353**, 317-326.
- Carlson TH, Atencio AC & Simon TL. (1985). Comparison of the behaviour in vivo of two molecular forms of antithrombin III. *Biochem J* **225**, 557-564.
- Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, Conzen P & Becker BF. (2009a). TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* **104**, 78-89.
- Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P & Rehm M. (2008a). [Expedition glycocalyx. A newly discovered "Great Barrier Reef"]. *Anaesthesist* **57**, 959-969.
- Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P & Becker BF. (2009b). Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* **83**, 388-396.

- Chappell D, Jacob M, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P & Becker BF. (2008b). Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem* **389**, 79-82.
- Chen HH BJ. (1998). C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**, S22-28.
- Cowie MR & Mendez GF. (2003). BNP and congestive heart failure. *Current Problems in Cardiology* **28**, 264-311.
- Curry FR, Rygh CB, Karlsen T, Wiig H, Adamson RH, Clark JF, Lin YC, Gassner B, Thorsen F, Moen I, Tenstad O, Kuhn M & Reed RK. (2010). Atrial natriuretic peptide modulation of albumin clearance and contrast agent permeability in mouse skeletal muscle and skin: role in regulation of plasma volume. *J Physiol* **588**, 325-339.
- Danielli JF. (1940). Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol* **98**, 109-129.
- de Bold AJ, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M & Khoshbaten A. (2001). The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol* **79**, 705-714.
- Desjardins C & Duling BR. (1990). Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol* **258**, H647-654.
- Dore JM, Morard F, Vita N & Wijdenes J. (1998). Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Lett* **426**, 67-70.
- Döring HJD, H. (1988). *The isolated perfused warm blooded heart according to Langendorff*. Biomesstechnik-Verlag March GmbH.
- Eisele B, Lamy M, Thijs LG, Keinecke HO, Schuster HP, Matthias FR, Fourrier F, Heinrichs H & Delvos U. (1998). Antithrombin III in patients with severe sepsis. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicenter trial plus a meta-analysis on all randomized, placebo-controlled, double-blind trials with antithrombin III in severe sepsis. *Intensive Care Med* **24**, 663-672.
- Ellis CG, Jagger J & Sharpe M. (2005). The microcirculation as a functional system. *Crit Care* **9 Suppl 4**, S3-8.

- Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G & Bernfield M. (2000). Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* **148**, 811-824.
- Forssmann WG, Richter R & Meyer M. (1998). The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol* **110**, 335-357.
- Forster H, Wicarkzyk C & Dudziak R. (1981). [Determination of the plasma elimination of hydroxyethyl starch and dextran using improved analytical methods]. *Infusionsther Klin Ernahr* **8**, 88-94.
- Furchgott RF. (1999). Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* **19**, 235-251.
- Furst R, Bubik MF, Bihari P, Mayer BA, Khandoga AG, Hoffmann F, Rehberg M, Krombach F, Zahler S & Vollmar AM. (2008). Atrial natriuretic peptide protects against histamine-induced endothelial barrier dysfunction in vivo. *Mol Pharmacol* **74**, 1-8.
- Gerber E, Bredy A & Kahl R. (1996). Ortho-phenanthroline modulates enzymes of cellular energy metabolism. *Toxicology* **110**, 85-93.
- Gotte M, Joussen AM, Klein C, Andre P, Wagner DD, Hinkes MT, Kirchhof B, Adamis AP & Bernfield M. (2002). Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1135-1141.
- Hamon M, Mbemba E, Charnaux N, Slimani H, Brule S, Saffar L, Vassy R, Prost C, Lievre N, Starzec A & Gattegno L. (2004). A syndecan-4/CXCR4 complex expressed on human primary lymphocytes and macrophages and HeLa cell line binds the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Glycobiology* **14**, 311-323.
- Harada K, Masuda S, Hirano M & Nakanuma Y. (2003). Reduced expression of syndecan-1 correlates with histologic dedifferentiation, lymph node metastasis, and poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* **34**, 857-863.
- Henry CB & Duling BR. (2000). TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2815-2823.

- Hooper NM, Karran EH & Turner AJ. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem J* **321** (Pt 2), 265-279.
- Hotchkiss RS & Karl IE. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* **348**, 138-150.
- Ignarro LJ. (1999). Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* **19**, 51-71.
- Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P & Becker BF. (2007a). The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovasc Res* **73**, 575-586.
- Jacob M, Chappell D, Conzen P, Finsterer U & Rehm M. (2008). Blood volume is normal after pre-operative overnight fasting. *Acta Anaesthesiol Scand* **52**, 522-529.
- Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Paul JO, Bruegger D, Welsch U, Conzen P & Becker BF. (2007b). The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation. *J Vasc Res* **44**, 435-443.
- Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y & Platt JL. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* **168**, 5233-5239.
- Kainulainen V, Wang H, Schick C & Bernfield M. (1998). Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J Biol Chem* **273**, 11563-11569.
- Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM & Bernfield M. (1998). Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med* **4**, 691-697.
- Klitzman B & Duling BR. (1979). Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol* **237**, H481-490.
- Koller KJ & Goeddel DV. (1992). Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* **86**, 1081-1088.

- Kuhn M. (2004). Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res Cardiol* **99**, 76-82.
- Kupatt C, Zahler S, Seligmann C, Massoudy P, Becker BF & Gerlach E. (1996). Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 643-654.
- Levick JR. (2004). Revision of the Starling principle: new views of tissue fluid balance. *J Physiol* **557**, 704.
- Li Q, Park PW, Wilson CL & Parks WC. (2002). Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* **111**, 635-646.
- Lim ST, Longley RL, Couchman JR & Woods A. (2003). Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. *J Biol Chem* **278**, 13795-13802.
- Lobo DN, Bostock KA, Neal KR, Perkins AC, Rowlands BJ & Allison SP. (2002). Effect of salt and water balance on recovery of gastrointestinal function after elective colonic resection: a randomised controlled trial. *Lancet* **359**, 1812-1818.
- Luft JH. (1966). Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* **25**, 1773-1783.
- Marechal X, Favory R, Joulin O, Montaigne D, Hassoun S, Decoster B, Zerimech F & Neviere R. (2008). Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock* **29**, 572-576.
- Marx G. (2003). Fluid therapy in sepsis with capillary leakage. *Eur J Anaesthesiol* **20**, 429-442.
- Massova I, Kotra LP, Fridman R & Mobashery S. (1998). Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* **12**, 1075-1095.
- Minamino N, Aburaya M, Kojima M, Miyamoto K, Kangawa K & Matsuo H. (1993). Distribution of C-type natriuretic peptide and its messenger RNA in rat central nervous system and peripheral tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 326-335.

- Miura T & Miki T. (2008). Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res Cardiol* **103**, 501-513.
- Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Isobe H, Harada N, Mizutani S & Noguchi T. (2003). Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production. *Blood* **101**, 3029-3036.
- Mulivor AW & Lipowsky HH. (2002). Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1282-1291.
- Mulivor AW & Lipowsky HH. (2009). Inhibition of glycan shedding and leukocyte-endothelial adhesion in postcapillary venules by suppression of matrixmetalloprotease activity with doxycycline. *Microcirculation* **16**, 657-666.
- Murad F. (1999). Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* **19**, 133-154.
- Nagase H & Woessner JF, Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-21494.
- Newman WH, Kato J, Becker BF & Currie MG. (1992). Difference in effect of atrial natriuretic peptide on cGMP in aortic and coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol* **263**, H710-714.
- Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ & Stroes ES. (2005). The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* **16**, 507-511.
- Nisanevich V, Felsenstein I, Almogy G, Weissman C, Einav S & Matot I. (2005). Effect of intraoperative fluid management on outcome after intraabdominal surgery. *Anesthesiology* **103**, 25-32.
- Palluk R, Gaida W & Hoefke W. (1985). Atrial natriuretic factor. *Life Sci* **36**, 1415-1425.
- Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M & Chen Y. (2004). Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by Staphylococcus aureus alpha-toxin and beta-toxin. *J Biol Chem* **279**, 251-258.

- Persson J & Grande PO. (2006). Plasma volume expansion and transcapillary fluid exchange in skeletal muscle of albumin, dextran, gelatin, hydroxyethyl starch, and saline after trauma in the cat. *Crit Care Med* **34**, 2456-2462.
- Platts SH & Duling BR. (2004). Adenosine A3 receptor activation modulates the capillary endothelial glycocalyx. *Circ Res* **94**, 77-82.
- Potter DR & Damiano ER. (2008). The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro. *Circ Res* **102**, 770-776.
- Pries AR & Kuebler WM. (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 1-40.
- Pries AR, Secomb TW & Gaehtgens P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* **440**, 653-666.
- Pries AR, Secomb TW, Sperandio M & Gaehtgens P. (1998). Blood flow resistance during hemodilution: effect of plasma composition. *Cardiovasc Res* **37**, 225-235.
- Redondo J, Bishop JE & Wilkins MR. (1998). Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol* **124**, 1455-1462.
- Rehm M, Zahler S, Lotsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M & Becker BF. (2004). Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* **100**, 1211-1223.
- Schreier B, Borner S, Volker K, Gambaryan S, Schafer SC, Kuhlencordt P, Gassner B & Kuhn M. (2008). The heart communicates with the endothelium through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of intravascular volume in response to volume expansion. *Endocrinology* **149**, 4193-4199.
- Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C & Lazdunski M. (1992). A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* **267**, 13928-13932.
- Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE & Mathieson PW. (2007). Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2885-2893.

- Starling EH. (1896). On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* **19**, 312-326.
- Stevens AP, Hlady V & Dull RO. (2007). Fluorescence correlation spectroscopy can probe albumin dynamics inside lung endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L328-335.
- Subramanian SV, Fitzgerald ML & Bernfield M. (1997). Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem* **272**, 14713-14720.
- Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C & Beavo JA. (2007). Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circ Res* **101**, 811-818.
- Sutherland FJ & Hearse DJ. (2000). The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* **41**, 613-627.
- Takata Y, Hirayama Y, Kiyomi S, Ogawa T, Iga K, Ishii T, Nagai Y & Ibukiyama C. (1996). The beneficial effects of atrial natriuretic peptide on arrhythmias and myocardial high-energy phosphates after reperfusion. *Cardiovasc Res* **32**, 286-293.
- Tarbell JM & Pahakis MY. (2006). Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* **259**, 339-350.
- Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S & Spray DC. (2004). The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a "bumper-car" model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16483-16488.
- Thomas L. (2005). *Labor und Diagnose*, vol. 6. Auflage. TH-Books.
- Tkachenko E, Rhodes JM & Simons M. (2005). Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* **96**, 488-500.
- Tozzi R, Palladini G, Fallarini S, Nano R, Gatti C, Presotto C, Schiavone A, Micheletti R, Ferrari P, Fogari R & Perlini S. (2007). Matrix metalloprotease activity is enhanced in the compensated but not in the decompensated phase of pressure overload hypertrophy. *Am J Hypertens* **20**, 663-669.

- Valenzuela-Fernandez A, Palanche T, Amara A, Magerus A, Altmeyer R, Delaunay T, Virelizier JL, Baleux F, Galzi JL & Arenzana-Seisdedos F. (2001). Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **276**, 26550-26558.
- van der Heijden M, Verheij JMD, van Nieuw Amerongen GP & Groeneveld AB. (2009). Crystalloid or colloid fluid loading and pulmonary permeability, edema, and injury in septic and nonseptic critically ill patients with hypovolemia. *Crit Care Med* **37**, 1275-1281.
- Vellaichamy E, Khurana ML, Fink J & Pandey KN. (2005). Involvement of the NF-kappa B/matrix metalloproteinase pathway in cardiac fibrosis of mice lacking guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A. *J Biol Chem* **280**, 19230-19242.
- Visse R & Nagase H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827-839.
- Vogel J, Sperandio M, Pries AR, Linderkamp O, Gaehtgens P & Kuschinsky W. (2000). Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1571-1578.
- Weber KT, Sun Y, Guarda E, Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP & Zhou G. (1995). Myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: an overview of potential regulatory mechanisms. *Eur Heart J* **16 Suppl C**, 24-28.
- Weinbaum S, Tarbell JM & Damiano ER. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* **9**, 121-167.
- Yang Y, Macleod V, Miao HQ, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD, Jr., Sawyer J, Li JP, Zcharia E, Vlodavsky I & Sanderson RD. (2007). Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem* **282**, 13326-13333.
- Zimmer HG. (1998). The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci* **13**, 203-210.
- Zimmerman RS, Trippodo NC, MacPhee AA, Martinez AJ & Barbee RW. (1990). High-dose atrial natriuretic factor enhances albumin escape from the systemic but not the pulmonary circulation. *Circ Res* **67**, 461-468.
- ZLB Behring. (2004). Gebrauchsinformation und Fachinformation Kybernin HS500.

7. Anhang

Tabelle 18: Ausschlusskriterien für Proben zur Laktatdiagnostik zu 3.5.1

Gruppe	n	Anteil gültige	No.	Grund des Ausschlusses
Kontrolle	9	77,7 %	10	Pulmonalkanüle verdreht
			16	langwierige Präparation, mehrere Perforationen
ANP 10^{-11} M	7	85,7 %	50	Verunreinigung der Basalwertprobe
ANP 10^{-10} M	7	77,7 %	19	Aortenkanüle bei Präparation abgerutscht
			30	hohe primäre Transsudatbildung
BNP	6	85,7 %	28	hohe primäre Transsudatbildung
CNP	10	50,0 %	31	prolongierte Präparation
			36	prolongierte Präparation
			37	hohe primäre Transsudatbildung
			39	stark geblähter Vorhof
			40	Vena cava bei Präparation abgerissen
AT III	7	71,4 %	41	hohe primäre Transsudatbildung
			67	hohe primäre Transsudatbildung
PI	4	75,0 %	57	Hämorrhagie epikardial und papillomuskulär

Versuchsprotokoll ANP-Studie
Themen-Sektor 200705/Untersuchungsprotokoll: VS.3.07.04-2011.3.08

Datum: 2007

Versuch Nr. K A B C I

Gewicht brutto: g

Gewicht netto: g

Gas: ml

ps

Präparation

Uhrzeit Beginn: Uhr

Präparator: Assistent: Beginn Perfusion: Uhrzeit Ende: Uhr

Uhrzeit Ende: Uhr

Beobachtungen Präparation:

T Effluent: °C

T Sparend: °C

P Überlauf: min/hp

Pförrerate: ml/min

Überlauf: ml/min

Sammeln der Proben

Beginn einer HES-Infusion

Uhrzeit Beginn: Uhr

Probe 5 t=40 min (20 min HES-Inf)

Uhrzeit Beginn: Uhr

Abnahme von Proben:

2 Epi 1,5 ml GRUVOL: 0051K01 ☐ 0043K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0053K01 ☐

Menge Transudat: 0051K01 ☐ 0043K01 ☐ 0053K01 ☐

2 Epi 1,5 ml transparent: 0054K01 ☐ 0055K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0056K01 ☐

20 ml Polyvalis: 0057K01 ☐ 0058K01 ☐

Menge Effluent: 0054K01 ☐ 0055K01 ☐ 0056K01 ☐ 0057K01 ☐ 0058K01 ☐

Versuchsende

Uhrzeit Ende: Uhr

Gesamtmenge Transudat: ml

T Effluent: °C

T Sparend: °C

Feuchtwicht: mg

Trockengewicht: mg

Gesamtmenge Effluent: ml

Anmerkungen:

2

Probe 0 - Nullwert

Uhrzeit Beginn: Uhr

Abnahme von Proben:

2 Epi 1,5 ml GELB: 0001K01 ☐ 0002K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0003K01 ☐

Menge Transudat: 0001K01 ☐ 0002K01 ☐ 0003K01 ☐

2 Epi 1,5 ml GELB: 0004K01 ☐ 0005K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0006K01 ☐

20 ml Polyvalis: 0007K01 ☐ 0008K01 ☐

Menge Effluent: 0004K01 ☐ 0005K01 ☐ 0006K01 ☐ 0007K01 ☐ 0008K01 ☐

Probe 1 - 0 bis 5 min

Uhrzeit Beginn: Uhr

Abnahme von Proben:

2 Epi 1,5 ml RÜSSA: 0011K01 ☐ 0012K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0013K01 ☐

Menge Transudat: 0011K01 ☐ 0012K01 ☐ 0013K01 ☐

2 Epi 1,5 ml RÜSSA: 0014K01 ☐ 0015K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0016K01 ☐

20 ml Polyvalis: 0017K01 ☐ 0018K01 ☐

Menge Effluent: 0014K01 ☐ 0015K01 ☐ 0016K01 ☐ 0017K01 ☐ 0018K01 ☐

Probe 2 - 5 bis 10 min

Uhrzeit Beginn: Uhr

Abnahme von Proben:

2 Epi 1,5 ml BLAU: 0021K01 ☐ 0022K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0023K01 ☐

Menge Transudat: 0021K01 ☐ 0022K01 ☐ 0023K01 ☐

2 Epi 1,5 ml BLAU: 0024K01 ☐ 0025K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0026K01 ☐

20 ml Polyvalis: 0027K01 ☐ 0028K01 ☐

Menge Effluent: 0024K01 ☐ 0025K01 ☐ 0026K01 ☐ 0027K01 ☐ 0028K01 ☐

Probe 3 - 10 bis 15 min

Uhrzeit Beginn: Uhr

Abnahme von Proben:

2 Epi 1,5 ml LILA: 0031K01 ☐ 0032K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0033K01 ☐

Menge Transudat: 0031K01 ☐ 0032K01 ☐ 0033K01 ☐

2 Epi 1,5 ml LILA: 0034K01 ☐ 0035K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0036K01 ☐

20 ml Polyvalis: 0037K01 ☐ 0038K01 ☐

Menge Effluent: 0034K01 ☐ 0035K01 ☐ 0036K01 ☐ 0037K01 ☐ 0038K01 ☐

Probe 4 - 15 bis 20 min

Uhrzeit Beginn: Uhr

Abnahme von Proben:

2 Epi 1,5 ml GRÜN: 0041K01 ☐ 0042K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0043K01 ☐

Menge Transudat: 0041K01 ☐ 0042K01 ☐ 0043K01 ☐

2 Epi 1,5 ml GRÜN: 0044K01 ☐ 0045K01 ☐

1 Epi 2 ml transparent: 0046K01 ☐

20 ml Polyvalis: 0047K01 ☐ 0048K01 ☐

Menge Effluent: 0044K01 ☐ 0045K01 ☐ 0046K01 ☐ 0047K01 ☐ 0048K01 ☐

Abbildung 21: Versuchsprotokoll

8. Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT III	Antithrombin III
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
DNP	D-Typ natriuretisches Peptid
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
HES	Hydroxyethylstärke
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
l	Länge (m)
M	Molmassenkonzentration (mol pro Liter)
MMP	Matrix-Metalloprotease
MW	Mittelwerte
n	Stichprobengröße
NO	Stickoxid
NPR	Natriuretischer Peptid-Rezeptor
OP	ortho-Phenanthrolin
PA(R)	Protease-aktivierter Faktor, (-Rezeptor)
P _a CO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
P _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PI	Proteaseinhibitor-Gemisch
PKC	Proteinkinase C
PS	Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt
SEM	Standardfehler
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloprotease

Danksagung

Den Herren Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Klaus Peter (ehemaliger Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der LMU) und Prof. Dr. med. Ulrich Pohl (Walter Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin) danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, sowie Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler (Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der LMU) für die Möglichkeit, die Arbeit zu Ende zu führen.

Herrn PD Dr. med. Markus Rehm danke ich als Arbeitsgruppenleiter sehr herzlich für die finanzielle und ideelle Unterstützung der Arbeit.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Matthias Jacob und dem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker möchte ich besonders für die Überlassung des Themas, Ihre entgegengebrachte Unterstützung, Geduld und Ausdauer in der experimentiellen Phase und für immer interessante Gespräche und Gedanken in der Phase der Auswertung danken. Prof. Becker hatte jederzeit großes Interesse an dem Fortschritt der Arbeiten und immer ein offenes Ohr für alle Belange zum Thema. Danken möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Daniel Chappell für die Unterstützung bei fast der Hälfte der Herzpräparationen und vielen Tipps und Tricks rund um die Doktorarbeit.

Ebenso danke ich Frau Gaby Gröger, Frau Maria Escobar und Frau Congcong Chen für die Durchführung der Bestimmung von HES und Glykokalyx-Bestandteilen im Forschungslabor der Klinik für Anaesthesiologie in Großhadern.

Frau Dora Kiesel verdanke ich die Bestimmung der metabolischen Parameter und viele wichtige praktische Hinweise aus ihrer langjährigen Erfahrung, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Für die freundliche Zusammenarbeit und die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder sei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch von der Anatomischen Anstalt der LMU herzlichst gedankt.

Ich möchte ebenso allen danken, die zwar nicht direkt an der Arbeit beteiligt waren, doch mit guten Hinweisen, Ideen und so mancher Ermutigung bei Rückschlägen doch zu ihrem Gelingen beigetragen haben; dabei vor allem meinen Söhnen, die mich jederzeit mit Ihren Ideen aufmuntern konnten.

Besonderen Dank möchte ich meinen Eltern zukommen lassen. Ohne ihre großzügige Unterstützung wäre nicht nur diese Arbeit, sondern auch mein Medizinstudium nicht möglich gewesen.

